

✓hp
THESIS

MUNICH

1965

ÜBER DIE ANREICHERUNG
VON GONADOTROPINEN IM HARN UND ÜBER
IMMUNHÄMATOLOGISCHE UND BIOLOGISCHE
GONADOTROPINBESTIMMUNGEN IM HARN BEI
AMENORRHOEN UND NACH DER MENOPAUSE

LANE MEDICAL LIBRARY OF
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR
PALO ALTO, CALIFORNIA

WALTER GEIGER



Dissertationsdruck Franz Frank, München 23,
Werneckstraße 27, Tel. 34 36 51

Aus der I. Frauenklinik und Hebammenschule der Universität München
Direktor: Professor Dr. W. Bickenbach

ÜBER DIE ANREICHERUNG VON GONADOTROPINEN IM HARN
UND ÜBER IMMUNHÄMATOLOGISCHE UND BIOLOGISCHE
GONADOTROPINBESTIMMUNGEN IM HARN
BEI AMENORRHOEN UND NACH DER MENOPAUSE

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Walter Geiger
Rosenheim

München 1965

Berichterstatter: Prof. Dr. R. Kaiser
Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Bickenbach
Dekan: Prof. Dr. O. Hug
Tag der mündl. Prüfung: 22. 6. 1965

Meinen lieben Eltern



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40154016_0030

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
I. A L L G E M E I N E R T E I L	1
1. Entdeckung, Lokalisation und Stoffwechsel der Gonadotropine	1
2. Physikalisch-chemische und physiologische Eigenschaften der Gonadotropine	2
3. Steuerung und Beeinflussung der Gonadotro- pinbildung	6
4. Bisherige Untersuchungen über die Gonado- tropinausscheidung bei Frauen nach der Menopause und mit sekundärer Amenorrhoe	9
II. N A C H W E I S V E R F A H R E N F Ü R G O N A D O T R O P E H O R M O N E	13
A. BIOLOGISCHE BESTIMMUNGEN	13
1. Prinzip des biologischen Testes	13
2. Anreicherungsverfahren	14
3. Arbeitsvorschrift der Kaolin-Adsorptions- methode nach Loraine und Brown und des Mäuseuterus-Testes nach Levin und Thyn- dale	16
4. Statistische Auswertung der Ergebnisse	18
B. DER IMMUNOLOGISCHE GONADOTROPINNACHWEIS	20
1. Allgemeines	20
2. Die Hämagglutinations-Verhinderungsreak- tion zum HCG-Nachweis nach Wide und Gem- zell	21
3. Der Pregnosticon-Test	27

	Seite
III. S P E Z I E L L E R T E I L -	
E I G E N E U N T E R S U C H U N G E N	29
A. ZUR METHODIK DES BIOLOGISCHEN TESTES	29
1. Vergleich des Gonadotropin-Hausstandards mit dem internationalen Standardpräparat HMG 20 A	29
2. Das Tiermaterial	32
3. Menge und Toxizität der Extrakte	32
B. ZUR METHODIK DES IMMUNOLOGISCHEN TESTES	33
1. Voruntersuchungen für quantitative Gonadotropinbestimmungen mit den Agenzien des Pregnosticon-Testes	33
2. Die Anreicherungsverfahren	37
a) Die Acetonfällung nach Wide	38
b) Die Kaolinadsorption nach Loraine und Brown	39
c) Die einfache Alkoholfällung	40
d) Die Alkoholfällung mit Reinigungs- schritt	41
C. BESTIMMUNG DER GONADOTROPINAUSSCHIEDUNG MIT BIOLOGISCHER UND IMMUNOLOGISCHER METHODE BEI FRAUEN NACH DER MENOPAUSE	45
D. BESTIMMUNG DER GONADOTROPINAUSSCHIEDUNG MIT BIOLOGISCHER UND IMMUNOLOGISCHER METHODE BEI FRAUEN MIT AMENORRHOEN	46
IV. D I S K U S S I O N D E R E R G E B N I S S E	49
V. Z U S A M M E N F A S S U N G	58
VI. T A B E L L E N U N D A B B I L D U N G E N	61
VII. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S	80

E I N L E I T U N G

In der Hypophyse werden drei verschiedene Gonadotropine gebildet: das follikelstimulierende Hormon (FSH), das zwischenzellenstimulierende Hormon (ICSH), welches dem luteinisierenden Hormon (LH) gleichzusetzen ist, und das luteotrope Hormon (LTH). Das aus menschlichem Menopausenharn gewonnene Gemisch dieser Hormone trägt die Bezeichnung HMG (Human Menopausal Gonadotrophin). Während der Schwangerschaft bildet die Plazenta große Mengen von Choriongonadotropin (HCG).

Alle diese Hormone werden zum Teil durch die Niere ausgeschieden und lassen sich als Gesamtgonadotropinkomplex oder als Einzelaktivitäten im Harn nachweisen. Bisher erfolgte die Bestimmung der Gonadotropine auf biologische Weise im Tiertest, da spezifische chemische Nachweisverfahren für Proteohormone nicht vorliegen. Seit drei Jahren ist ein immunhämatologischer Nachweis für HCG bekannt, der auch das hypophysäre LH mit erfaßt.

In der vorliegenden Arbeit wird ein Anreicherungsverfahren für hypophysäres Harngonadotropin beschrieben, das in Verbindung mit dem immunhämatologischen Schwangerschaftstest nach WIDE und GEMZELL den Nachweis auch kleiner Hormonmengen ermöglicht. Die Gonadotropinausscheidung wurde auf diese Weise bei Frauen mit Amenorrhoeen und in der Postmenopause immunhämatologisch und parallel dazu in den gleichen Urinen biologisch bestimmt. Als biologisches Nachweisverfahren diente die Mäuseuterus-Methode von LEVIN und TYNDALE in Verbindung mit der Extraktionsmethode nach LORAINÉ und BROWN.



I. ALLGEMEINER THEIL

1. Entdeckung, Lokalisation und Stoffwechsel der Gonadotropine

Schon 1909 hat ASCHNER (16) in Versuchen an Hunden gezeigt, daß die Entfernung der Hypophyse zur vollständigen Atropie von Ovarien und Hoden führt. 1922 entdeckten EVANS und LONG (48) einen "Ovarialhemmstoff" in der Hypophyse, der sich später als das Gegenteil, nämlich als ein die Ovarien stimulierendes Hormon erwies und deshalb "Gonadotropin" genannt wurde. ASCHHEIM und ZONDEK (15) klärten die Beziehung zwischen Ovarialfunktion und Hypophyse im Jahre 1927 auf. Die gleichen Autoren (14), KIDO (76) und MURATA und ADACHI (97) fanden außerhalb der Hypophyse noch eine weitere Produktionsstätte eines gonadotropen Wirkstoffes in der Plazenta. FEVOLD, HISAW und LEONARD (51) unterschieden beim hypophysären Gonadotropin zwei Wirkungen, eine follikelstimulierende und eine luteinisierende, die sie verschiedenen Anteilen des Gesamthormons zuschrieben.

Obwohl das Prolaktin, ein weiteres Hormon der Hypophyse, schon 1928 von GRUETER und STRICKER entdeckt worden war, erkannte man dessen gonadotrope Wirkung erst 10 Jahre später (EVANS u.a., 49). Da es bei Ratten die Progesteronbildung des Corpus luteum veranlaßt, wurde es luteotropes Hormon (LTH) genannt.

Die Gonadotropine werden nur zum kleinen Teil in den Harn ausgeschieden, und zwar nach JOHNSEN und HAMBURGER (69) zu 6 % und nach SALVATIERRA (zit. n. 9) zu 7,7 %, während der

größte Teil mit ziemlicher Sicherheit im retikuloendothelialen System (RES) abgebaut wird, was v. EICKSTÄDT (46) durch Blockierung der retikuloendothelialen Zellfermente nachweisen konnte.

Nachdem die gonadotropinbildenden Organe bekannt waren, versuchten mehrere Autoren, die Entstehungsorte in bestimmte Zellen oder Zellbestandteile zu lokalisieren. Durch Kastration und anschließend isolierte Hemmung der ICSH-Aktivität konnten HELLBAUM (59) und RENNELS (104) die Bildung von ICSH nach PAS-Methylenblau-Färbung in den roten Zellen, die von FSH in den purpurnen Zellen des Hypophysenvorderlappens annehmen. PURVES und GRIESBACH (101) sprechen dagegen den basophilen Zellen die Bildung beider Hormone zu, unterscheiden aber zwischen den Zellen der Peripherie mit FSH-Bildung und den Zellen des Zentrums mit ICSH-Produktion. Bei der Auswertung von Ultrazentrifugaten homogenisierter Hypophysen fanden BROWN u.a. (29) ICSH und STH (Somatotropes Hormon) in den acidophilen Granula und FSH in verschiedenen Fraktionen. Als Entstehungsort des HCG geben KIDO (76) und STEWARD (116) die Langhans'schen Zellen des Zytotrophoblasten und THOMSON und WILLEMSSEN (119) die Trophoblastenzellen der Basalplatten, Plazentarsepten, Zottenkappen und Inseln an.

2. P h y s i k a l i s c h - c h e m i s c h e u n d p h y s i o l o g i s c h e E i g e n s c h a f t e n d e r G o n a d o t r o p i n e

Obwohl die Struktur der Gonadotropine noch weitgehend ungeklärt ist, konnten doch schon einige physikalische Daten

für die einzelnen Fraktionen ermittelt werden.

So wird z.B. das menschliche FSH als ein Glykoproteid mit einem Kohlenhydratanteil von 6 bis 8 % und einem Molekulargewicht von ca. 29000 angesehen. Es bewirkt bei hypophysekтомierten Ratten die Entwicklung beweglicher Spermatozoen, wobei aber die Anhangsdrüsen mangels Androsteronbildung atrophieren. Am Ovarium fördert es die Ausbildung von Follikeln. Nach neuesten Untersuchungen von WOODS und SIMPSON (129) soll das reine FSH jedoch keinerlei biologische Wirkung aufweisen. Jede biologische Reaktion stelle demnach einen Synergismus dar, wobei durch das Überwiegen der einen oder der anderen Fraktion verschiedene Wirkungen erzielt werden.

Das ICSH, ebenfalls ein Glycoproteid vom Molekulargewicht 40000 (beim Schaf) bzw. 100000 (beim Schwein), stimuliert die Zwischenzellen bei beiden Geschlechtern und fördert somit die Bildung der geschlechtsspezifischen Steroidhormone. Außerdem soll es im Ovarium mit FSH zusammen den Follikelsprung und anschließend die Umbildung des Follikels in das Corpus luteum veranlassen. Zusammen mit dem LTH induziert es die Progesteronausschüttung des Corpus luteum.

Das HCG steht nach CLAEßSON (38) bereits in kristallisierter Form zur Verfügung. Es handelt sich um ein Glykoproteid mit relativ hohem Kohlenhydratgehalt und einem Molekulargewicht von rund 100000 (ODEBLAD, 99). Das HCG weist fast ausschließlich ICSH-Wirkung auf und wird in der Therapie als ICSH-Ersatz gebraucht. Es führt bei hypophysekтомierten Ratten ausschließlich zu einer Stimulierung der Zwischenzellen und nicht zu einem Follikelwachstum, bei intakten

Tieren zeigt sich allerdings ein synergistischer Effekt mit dem eigenen FSH und führt somit zur Follikel- und Corpus-luteum-Bildung.

Im Gegensatz zu diesen 3 gonadotropen Hormonen besitzt das LTH, ebenfalls ein Proteid, keinen Zuckeranteil. Seine Wirkung auf das Corpus luteum ist bisher nur bei Ratten nachgewiesen (EVANS u.a., 49), wird aber auch für den Menschen vermutet, wogegen seine laktotrope Wirkung nach der Gravidität gesichert ist.

Der molekulare Aufbau der hypophysären und chorialen Gonadotropine ist bis heute noch nicht geklärt. So herrscht auch keine Klarheit darüber, ob es sich bei den ICSH- und FSH-Aktivitäten um zwei getrennte Hormone handelt, ob sie nur Komponenten eines größeren Trägermoleküls sind, vergleichbar den prosthetischen Gruppen eines Enzyms, und ob sie in konstantem Verhältnis zueinander abgegeben werden oder nicht. Die Verfechter der Einheitstheorie wie ARON (12, 14) und mit Einschränkung die EVANS'sche Schule (47) halten eine artefizielle Aufspaltung des Moleküls bei der chemischen Extraktion für möglich. Sie führen dabei an, daß die einzelnen Teile für sich nicht alle physiologischen Wirkungen reproduzieren können, während der Gesamt-Gonadotropin-Komplex nur durch Änderung seiner Konzentration entweder ICSH- oder FSH-Wirkung aufweist. In diesem Sinne sind auch die Untersuchungen von ALBERT (2, 4, 6, 8) und SEGALOFF u.a. (112) zu deuten, die mit verschiedenen Extraktionsmethoden aus Harnproben von Männern und Frauen jeden Alters immer ein qualitativ gleiches Gonadotropin extrahierten. Ein einheitliches Gonadotropin in der Menopause fanden auch KOVACIC

und LORAINÉ (79), wogegen WALTER (122) in dieser Periode qualitative Unterschiede feststellte. Trotzdem hat sich bis heute mehr die Dualitätstheorie durchgesetzt, da die Mehrzahl der Autoren anhand von chemischen Analysen, histologischen Untersuchungen und Parabiose-Versuchen eine voneinander unabhängige Ausschüttung der beiden Hormone annimmt.

Die Feststellung von 2 hormonaktiven Substanzen, die in unterschiedlichem Verhältnis zueinander auftreten, läßt immer noch die Möglichkeit offen, daß es sich um 2 nicht-proteinartige Gruppen handelt, die in wechselndem Verhältnis einem Trägermolekül anhaften RIGAS u.a. (105). Bei der papierchromatographischen Zerlegung von höchstgereinigten HCG-Präparaten fanden KLUNGSÖYR und STÖA (78) in der Hauptsache ein Mucopolysaccharid, das sich auch im Harn von Nichtschwangeren und von Männern nachweisen läßt. SCHNEIDER und FRAHM (111) zerlegten ein hochgereinigtes HCG-Präparat in 5 aktive Phasen und JOHNSEN (67) adsorbierte an Permutit ein FSH-ICSH-Gemisch aus Menopausenharn von etwa der dreifachen Aktivität des "reinen" FSH von LI (85). Alle drei Autoren schließen deshalb auf eine niedermolekulare gonadotrop-aktive Substanz, die in wechselnder Menge an ein Mucopolysaccharid bzw. Glycoproteid gebunden ist.

Die enge Verwandtschaft, die HCG und ICSH hinsichtlich ihrer biologischen Wirkung zeigen, scheint sich auch in ihrem molekularen Aufbau widerzuspiegeln. In immunologischen Versuchen konnten nämlich Kreuzreaktionen zwischen ICSH und HCG-Antiserum, sowie HCG und ICSH-Antiserum festgestellt werden. Weiterhin finden sich sowohl bei der enzy-

matischen (WETTSTEIN, 126; v. EICKSTEDT, 46) und elektrophoretischen (NAGI u.a., 98) Zerlegung von HCG als auch bei der elektrophoretischen Aufspaltung von ICSH (SCHNEIDER und FRAHM, 111; JUSTICE und SQUIRE, 71) mehrere gleichartige Bruchstücke mit verhältnismäßig hoher biologischer Aktivität.

Das Problem der Einheitlichkeit oder Verschiedenheit der Harn-Gonadotropine ist zugleich das Problem des Standards, den man benötigt, um gonadotrope Aktivitäten aus verschiedenen Urinen und aus verschiedenen Forschungsstätten miteinander vergleichen zu können. Vom Gonadotropin-Club wurde ein Gonadotropinpräparat aus Postmenopausenharn hergestellt und als Standard vorgeschlagen. Es trägt den Namen HMG 20 A. Die Aktivität von 1 mg dieses Präparats wurde als eine Einheit definiert. Es gibt ferner einen Standard für HCG, sowie weitgehend gereinigte Präparate als FSH- und ICSH-Standard. Letztere sind aus Hypophysengewebe aufgearbeitet und nicht aus dem Harn isoliert. Kritische Stellungnahmen zu diesem Standardproblem finden sich bei JOHNSEN (70) und ALBERT (1, 2).

3. Steuerung und Beeinflussung der Gonadotropinbildung

Obwohl die Ausscheidungsverhältnisse der hypophysären und ovariellen Hormone während des menstruellen Zyklus quantitativ bestimmbar sind, ist die Ursache der Periodizität noch weitgehend ungeklärt. Außer Zweifel steht jedoch die gegenseitige Beeinflussung der peripheren und zentralen

Hormonbildung im Sinne eines Reglersystems, das im Hypothalamus überwacht wird (BICKENBACH, 19; LABHART, 80; MANDEL, 95; ROTCHILD, 107). Was das Gesamtgonadotropin betrifft, so gilt folgendes Regulationsprinzip als erwiesen: Das Zwischenhirn ist auf einen bestimmten Keimdrüsenhormonspiegel im Blut eingestellt. Das Absinken dieses Spiegels veranlaßt das Zwischenhirn, stimulierende Impulse an den Hypophysenvorderlappen zur Gonadotropinbildung zu geben. Ob die Impulse auch auf neuralem Weg durch den Tractus hypothalamo-hypophyseus übermittelt werden oder ob es sich ausschließlich um die von HARRIS und JACOBSON (58) nachgewiesene, neurovaskuläre Vermittlung chemischer Überträgerstoffe auf dem Weg über die hypophysären Portalgefäße handelt, ist noch nicht endgültig entschieden.

Die vermehrte Gonadotropinausschüttung bewirkt in den Ovarien eine Erhöhung der Östrogen- bzw. Progesteron-Produktion. Der Anstieg des Keimdrüsenhormon-Blutspiegels, der auch durch parenterale Zuführung erreicht werden kann, bewirkt eine Hemmung der HVL-Stimulierung vom Zwischenhirn aus und somit eine Verminderung der Gonadotropinaktivität. Da die Keimdrüsen nur unter der Einwirkung der gonadotropen Hormone funktionieren können, wirkt die Höhe des Keimdrüsenhormonspiegels indirekt auf die Tätigkeit der Keimdrüsen zurück. Ein "Sexualzentrum" im Zwischenhirn mit den beschriebenen Funktionen wurde zuerst von HOHLWEG und JUNKMANN (64) 1932 postuliert, später dann durch Hypophysenstieldurchtrennung (WESTMANN, 125; HARRIS und JACOBSON, 58), Zwischenhirnläsionen (HILLARP, 62) und u.a. auch durch Injektionen von Hormonen ins Zwischenhirn (HOHLWEG und DAUME, 63)

bewiesen. Das neurophysiologische Substrat des Sexualzentrums besteht aus einer Reihe von Zwischenhirnkernen, deren Beteiligung an diesen Regulationen nachgewiesen ist (SCENTAGOTHAI, FLERKO, MESS und HALASZ, 110). Es besteht weiterhin die Vorstellung, daß Östrogene, Gestagene, Androgene und Gonadotropine gleichzeitig, aber in wechselndem Verhältnis produziert und sowohl Eisprung als auch Menstruationsblutung durch charakteristische Konzentrationsverhältnisse ausgelöst werden (HAMMERSTEIN, 57). Dabei wird dem FSH der Anreiz zur Bildung neuer Sekundär- und Tertiärfollikel zugeschrieben, die dann bei ansteigendem ICSH zur Östrogenbildung angeregt werden. Die maximale Konzentration der beiden Gonadotropine in der Zyklusmitte, die in fester zeitlicher Korrelation zum Basaltemperaturanstieg steht (KAISER, MACKERT und KEYL, 73), soll für die Ovulation verantwortlich sein. Die Östrogene in hoher Konzentration und auch das Progesteron - jedoch weit schwächer - entfalten eine starke zentrale Bremswirkung (SAWYER, 109; LLOYD, 87; HOOGSTRA, 65, BUCHHOLZ, 32), während niedrige Dosen von Östrogenen die Produktion von Gonadotropinen eher fördern sollen. BUSCHBECK (33) weist besonders auf eine mögliche örtliche Wirkung der Östrogene und Androgene im Ovarium hin.

Bis zu einem gewissen Grade werden zyklische Vorgänge auch durch Impulse aus der Großhirnrinde, die dieser im wesentlichen über die Sinnesorgane zugehen, beeinflusst. Diese spielen bei manchen Tieren eine größere Rolle als beim Menschen (TALEISUIK und McCANN, 117). Man denke nur an den Einfluß des Lichtes auf Zyklus und Ovulation bei Vögeln

und Säugetieren (SKREB, 113), an die stimulierende Wirkung von Nestbaumaterial bei Tauben (LEHRMANN, 82) oder an die sog. "Notstandsamenorrhoe" (TIETZE, 120), "Fluchtamenorrhoe" (MARTIUS, 96) und "Nachkriegsamenorrhoe" (HEYNE-MANN, 61).

Die neurale Beeinflussung des Sexualzentrums in zentripetal-er Richtung beweisen die Reizwirkung der Kohabitation auf nicht spontan ovulierende Arten bzw. das Ausbleiben dieser Ovulation nach Durchtrennung des Rückenmarkes (BICKENBACH u.a., 21), sowie die künstliche Ovulation nach Cervix-Reizung, die auch beim Menschen geglückt ist (BICKENBACH u.a., 20).

4. B i s h e r i g e U n t e r s u c h u n g e n ü b e r d i e G o n a d o t r o p i n a u s - s c h e i d u n g b e i F r a u e n n a c h d e r M e n o p a u s e u n d m i t s e - k u n d ä r e r A m e n o r r h o e

Durch den Abfall der ovariellen Östrogenproduktion nach der Menopause fehlt die Hemmung auf die hypophysäre Gonadotropinausschüttung, die deshalb zu dieser Zeit, in der sich gleichsam eine "physiologische Kastration" vollzieht, erheblich gesteigert ist (12, 28, 68, 92). Da die Funktion des Ovariums nicht plötzlich erlischt, sondern über längere Zeit noch eine unregelmäßige Östrogenbildung besteht, sind die Schwankungen der Gonadotropinausschüttung in dieser Zeit dementsprechend groß.

Die Höhe des Gonadotropinspiegels beträgt nach JOHNSEN (68) in den ersten Jahren des Klimakteriums das Zehnfache des

Zyklusdurchschnitts (140 E HMG 20 A gegenüber 14 E HMG 20 A) und nach 10 bis 30 Jahren noch das Fünf- bis Siebenfache (ca. 90 E). In einer späteren Arbeit stellt JOHNSEN aber keine Beziehung zwischen Hormonmenge und Alter mehr fest.

McARTHUR u.a. (12) geben für die ICSH-Ausscheidung während des Zyklus 14 bis 16 R.E., während der Menopause 24 bis 96 R.E., also eine Steigerung auf das Sechsfache an.

Bei 57 Untersuchungen fand P.S. BROWN (28) Schwankungen von 10 bis 200 E HMG 20 A, und zwar weitgehend unabhängig von der Zeit nach der Menopause. Die Tagesschwankungen waren beträchtlich (bis 1 : 9), die Differenzen bei wiederholten Bestimmungen aus einem Urin hielten sich jedoch in normalen Grenzen, so daß die Abweichungen nicht auf einen methodischen Fehler zurückzuführen waren.

Zeit nach der Menopause	E HMG 20 A	Zahl der Fälle
1 Jahr	20,5	2
2 Jahre	22,5	2
3 Jahre	118,0	8
4 Jahre	101,0	5
5 Jahre	57,0	6
6 Jahre	26,5	2
7 Jahre	60,6	9
9 Jahre	49,5	2
10 Jahre	67,1	9
11 - 15 Jahre	71,5	10
16 - 22 Jahre	102,0	6

Tabelle A

Die Tabelle zeigt Untersuchungen von P.S. BROWN (28) über die Gonadotropinausscheidung von Frauen nach der Menopause.

ALBERT u.a. (7) fanden bei 110 gesunden Frauen Gonadotropinausscheidungen von 0 bis 35 Ratten-Einheiten/24 Std. während der Geschlechtsreife und 14 bis 205 Ratten-Einheiten/24 Std. nach der Menopause. Die Post-Menopausenwerte steigen mit zunehmendem Abstand von der Menopause kontinuierlich an und erreichten nach 15 bis 20 Jahren ihren Gipfel (100 R.E./24 Std.). Ähnliche Ergebnisse hatten PEDERSON-BJERGAARD und TONNESEN (100) schon 1948 mitgeteilt.

Bleibt die Menstruationsblutung im geschlechtsreifen Alter außerhalb einer Schwangerschaft mindestens 4 Monate aus, so spricht man von sekundärer Amenorrhoe (BROWN, 27; STOCKEL, 81). Diese kann (nach KAISER, 72) bedingt sein durch Störungen in Uterus, Ovarium, in der Nebennierenrinde, in der Hypophyse, im Zwischenhirn und durch Einflüsse aus der Großhirnrinde. Eine genaue Lokalisation der die Amenorrhoe verursachenden Störung ist deshalb unbedingt notwendig, da sowohl die Prognose als auch die Therapie davon abhängen.

Eine Klärung der Amenorrhoeursache wird in manchen Fällen erst durch die Bestimmung der Gonadotropinausscheidung ermöglicht (TAUBERT, 118), derzufolge 3 Arten von Amenorrhoeen unterschieden werden:

1. die hypogonadotrope Amenorrhoe
2. die normogonadotrope Amenorrhoe
3. die hypergonadotrope Amenorrhoe.

P.S. BROWN (27) setzte aufgrund therapeutischer Erfahrung die Grenzen zwischen diesen Gruppen auf 10 E HMG 20 A und 60 E HMG 20 A fest. BETTENDORF (18) konnte bei Frauen mit 15 bis 20 E HMG 20 A-Ausscheidung und mehr keine erfolg-

reiche Gonadotropinsubstitution mit menschlichem Hypophysenhormon durchführen und nimmt daher diese Gruppe als Grenze zum hypergonadotropen Zustand.

Amenorrhoeen mit sehr hoher Gonadotropinausscheidung sind meistens auf einen Ausfall der Ovarialfunktion zurückzuführen und gleichen somit dem physiologischen Zustand der Post-Menopause.

II. NACHWEISVERFAHREN FÜR GONADOTROPE HORMONE

A. BIOLOGISCHE BESTIMMUNGEN

Die Gonadotropine entziehen sich vorerst noch der Möglichkeit einer chemischen Bestimmung, da in ihrem molekularen Aufbau keine für sie charakteristischen chemischen Gruppen bekannt sind. Zu ihrem Nachweis standen bis vor kurzem ausschließlich biologische Methoden zur Verfügung.

1. P r i n z i p d e s b i o l o g i s c h e n T e s t e s

Das Prinzip des biologischen Testes besteht in der Beurteilung der physiologischen Veränderungen an den Erfolgsorganen von Testtieren nach parenteraler Zufuhr von Gonadotropinen. Um einen unkontrollierbaren Synergismus mit den tier-eigenen Hormonen auszuschließen, ist es notwendig, hypophy-sektomierte oder zumindest infantile Tiere zu verwenden.

Sowohl die direkt am Erfolgsorgan bewirkten Primäreffekte, z.B. die Vergrößerung des Ovariums, als auch die indirekten, östrogenbedingten Sekundäreffekte, z.B. die Vergrößerung des Uterus, werden zur Beurteilung des parenteral zugeführten Hormons herangezogen. Dabei sind einige der Reaktionen für eine bestimmte Gonadotropinfraktion spezifisch, z.B. der Prostatagewichtstest für LH (GREEP u.a., 56) oder der Ovar-Argumentationstest für FSH (STEELMAN und POHLEY, 115). Zur Bestimmung des Hormongemisches HMG, das als Ganzes er-

faßt werden kann, stellt die Mäuse-Uterus-Methode nach KLINEFELTER (77) eine geeignete Methode dar, insbesondere, wenn man ihre hohe Empfindlichkeit und Genauigkeit und die für ein biologisches Verfahren relativ einfache Handhabung berücksichtigt.

An die Spezifität wird bei dieser Methode keine allzu große Anforderung gestellt, da sie nicht die Wirkung einer einzelnen Gonadotropinfraktion sondern den Synergismus von LH und FSH mißt.

Die Empfindlichkeit wird durch die Größenordnung der Dosis bestimmt, die eine meßbare Reaktion hervorruft. Sie beträgt für eine sichtbare Vergrößerung des Mäuseuterus ca. 1 mg HMG-Standard.

Da sich die Schwankungen der Ergebnisse aufeinanderfolgender Bestimmungen in normalen Grenzen bewegen, wenn gleiches Tiermaterial zur Testung verwendet wird, sind die Forderungen nach Genauigkeit und Reproduzierbarkeit weitgehend erfüllt.

2. Anreicherungsverfahren

Außerhalb der Schwangerschaft werden nur sehr geringe Gonadotropinmengen mit dem Urin ausgeschieden. Deshalb ist es notwendig, sie mittels einer geeigneten Methode anzureichern und für den Tiertest von toxischen Beimengungen zu befreien.

Die ersten Versuche einer Anreicherung gehen auf das Jahr 1931 zurück, als ZONDEK (130) durch einfaches Mischen mit

Alkohol aus Urinen aktive Fällungen gewann, deren Menge und Toxität den Tierversuch allerdings sehr beeinträchtigten.

Das Bemühen mehrerer Autoren ging deshalb in der Folgezeit dahin, die inaktiven und toxischen Beimengungen vom aktiven Anteil durch wiederholte Fällung oder Adsorption oder durch die Kombination beider Verfahren abzutrennen.

Zur Fällung fanden Alkohol (HELLER, 60), Aceton (ENGLE, 47) oder Benzoesäure-Wolframsäure (BUTT, 36) Verwendung, zur Adsorption anorganische Verbindungen wie Aluminiumhydroxyd (MALBURY, 94), Kaolin (ALBERT, 6; JOHNSEN, 66; LORAINÉ, 89; 91), Biodeminvolit (BUTT, 37), Tricalciumphosphat (BUTT und CROOKE, 34 und 39), sowie die organische Benzoesäure (BUTT und CROOKE, 34). In zunehmendem Maße wurde dabei die Notwendigkeit einer genauen pH-Wert-Einstellung bei den Fällungs-, Adsorptions- und Elutionsschritten erkannt, wodurch sich der Gonadotropinkomplex in einzelne Hormonaktivitäten zerlegen ließ.

LORAINÉ und BROWN (89) adsorbierten z.B. das HCG des Urins bei pH 7 vollständig an Tricalciumphosphat, während HMG zu über 90 % in Lösung blieb; bei pH 8,3 hingegen beobachteten sie eine weitgehende Entgiftung der Harnextrakte. Zur Ermittlung des Gesamt-Gonadotropins hat sich die von LORAINÉ und BROWN angegebene Methode bewährt, nach der auch ein Standard für Harngonadotropine (HMG) hergestellt wurde.

Der "Gonadotropin-Club" definierte danach die Aktivität eines Milligramms dieser Präparation als eine internationale HMG-Einheit und gab ihr den Namen HMG 20 bzw. nach einem besonderen Trocknungsverfahren HMG 20 A.

3. Arbeitsvorschrift der Kaolin-Adsorptionsmethode nach LORAINE und BROWN (89) unter Berücksichtigung neuerer Erkenntnisse (LORAINE und BROWN 26, 88, 90, 91) und des Mäuseuterus-Testes n. LEVIN u. THYNDALE (83)

a) Die Gewinnung des Extraktes

Adsorption: Unter der Kontrolle eines pH-Meters wird der gesamte Urin mit 1- normaler HCl auf pH 4,0 eingestellt. Für jeweils 100 ml Urin werden 2 g Kaolin (Bolus alba der Firma Merck) in 5 ml Wasser suspendiert und mit dem Harn vermischt. Die Suspension kommt nun für 45 Minuten in eine Schüttelmaschine und anschließend zum Absetzen des Kaolins für 20 Minuten in den Kühlschrank bei 4° C. Nach Abgießen des klaren Überstandes wird das Kaolin aus der restlichen Suspension durch Zentrifugieren (4000 U/Min. 10 Min.) abgetrennt.

Elution: Das Kaolin wird in der gleichen Menge destillierten Wassers (5 ml/2 g Kaolin) suspendiert. Bei pH 11,3- eingestellt mit 1/10- normaler NaOH- trennt sich das Gonadotropin vom Kaolin und geht in Lösung. Der gonadotropinhaltige Überstand wird nach 20 Minuten durch Zentrifugieren vom Kaolin getrennt und mit 1/10- normaler HCl auf pH 5,0 eingestellt.

Präzipitation: Die Lösung wird mit dem 5-fachen Volumen Aceton vermischt. Dabei formt sich ein Präzipitat, das sich im Kühlschrank nach einer halben Stunde vollkommen gebildet und weitgehend abgesetzt hat. Anschließend wird es abzentrifugiert, mit Alkohol und Äther gewaschen und in einem Exsiccator aufbewahrt.

Reinigung: Das Präzipitat wird gewogen, in 20 ml Aqua dest. pro Gramm suspendiert, auf pH 8,3 eingestellt und 20 Minuten lang umgerührt. Der unlösliche Rückstand wird abzentrifugiert, nochmals mit 5 ml Aqua dest. ausgewaschen und nach abermaligem Zentrifugieren verworfen. Die beiden Überstände werden vereinigt und mit 4 ml Trikalziumphosphat-Suspension pro 25 ml versetzt. Unter pH-Kontrolle wird die Suspension 15 Minuten lang umgerührt und wieder 10 Minuten zentrifugiert.

Die überstehende Lösung stellt man mit 1/10- normaler HCl auf pH 5,0 ein und vermischt sie mit der 5-fachen Menge Aceton. Das Präzipitat wird für 30 Minuten in den Kühlschrank gestellt, zentrifugiert, mit Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet.

Der so gereinigte gonadotropinhaltige Extrakt wird im Exsiccator über Kalziumchlorid aufbewahrt.

b) Herstellung der Testlösung

Die gereinigten Extrakte werden gewogen und in zwei Hälften geteilt, wovon die eine jeweils zur ungefähren Abschätzung der Aktivität im Vortest dient. Vom Urinextrakt amenorrhöischer Frauen bekommen je 2 Mäuse 1/5, 1/10, 1/20 und 1/40 der Tagesmenge, vom Menopausenextrakt 1/10, 1/20, 1/40 und 1/80 der Tagesmenge injiziert.

Die einzelnen Konzentrationen werden mittels einer Verdünnungsreihe hergestellt. Die zweite Hälfte des Extraktes dient der genauen Testierung mit 4 Tieren pro Dosis innerhalb des durch den Vortest eingengten Bereiches.

c) Aktivitätsbestimmung am Mäuseuterus-Test

Als Testtiere dienen 8 bis 10 g schwere, 20 bis 22 Tage alte infantile weiße weibliche Mäuse vom Stamm NMRI. Jeder Maus wird im Abstand von 24 Stunden jeweils 0,33 ml der Extraktlösung unter die Rückenhaut gespritzt (vergl. ECKERTOVA, 45). 72 Stunden nach der ersten Injektion werden die Tiere mit Aether getötet und die Uteri sofort präpariert. Bis zur Wägung werden diese auf ein mit 0,9%-iger NaCl-Lösung getränktes Filterpapier gelegt.

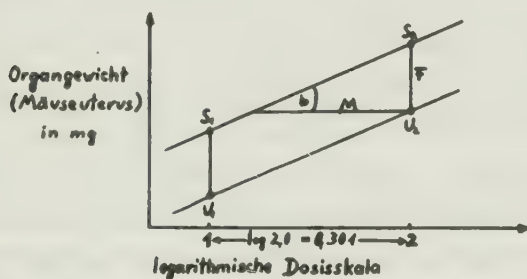
4. Statistische Auswertung der Ergebnisse (DICZFALUSY und HEINRICH S, 43; FINNEY, 52; GADDUM, 53)

In einem relativ schmalen Bereich steigt das Uterusgewicht in Abhängigkeit von der Dosierung S-förmig an, während sowohl unterschwellige als auch maximale Hormongaben kein Verhältnis zur Dosis erkennen lassen. Durch logarithmisches Auftragen der Dosen läßt sich der kurvenförmige Anstieg begradigen. Die Auswertung einer biologischen Bestimmung besteht nun im Vergleich der Wirkungsgeraden des unbekannten Präparates mit derjenigen des bekannten Standards, da für gleiche Aktivitäten ein gleicher Uterusgewichtsanstieg erwartet werden darf. Für das unbekannte Präparat schätzt man in einem Vorversuch den Bereich des optimalen Anstiegs ab. Der horizontale Abstand der beiden so erhaltenen Geraden stellt in delogarithmierter Form den zahlenmäßigen Ausdruck des Aktivitätsunterschiedes beider Präparate dar:

$$\text{antilog } M = R = \frac{\text{vermutete Aktivität}}{\text{ermittelte Aktivität}}$$

bzw. ermittelte Aktivität = $R \times$ vermutete Aktivität

Die vermutete Aktivität ergibt sich aus der Gleichsetzung entsprechender Dosen der beiden Präparate, also von S_1 (S = Standard) mit U_1 (U = Unbekanntes Präparat) bzw. S_2 mit U_2 . Der dadurch begangene Fehler wird durch R ausgeglichen.



Darstellung der Wirkungsgeraden nach dem 4-Punkte-Prinzip.

Ein sinnvolles Ergebnis der Berechnung ist nur zu erwarten, wenn die Voraussetzungen erfüllt sind, auf denen das Rechenverfahren beruht. Sie werden mit Hilfe der Gültigkeitskriterien geprüft und betreffen im Einzelnen die Regression (d.h. die deutliche Abhängigkeit des Uterusgewichtes von der Dosis), die Parallelität der Wirkungsgeraden und die gleiche Wirkung (von unbekanntem Präparat und Standard).

Rechnerisch ergibt sich eine befriedigende Regression mittels des g -Kriteriums von FINNEY bei $g < 1,0$. Aus einer von FINNEY aufgestellten Tabelle entnimmt man den für diese Versuche zutreffenden Tafelwert $t = 2,18$ (für 4 Tiere pro Dosis ist der Freiheitsgrad 12), der bei gesicherter Parallelität bzw. gleicher Wirkung jeweils größer sein muß als die

errechneten t-Werte t_1 bzw. t_2 .

Die statistische Sicherung und Verlässlichkeit der Ergebnisse erfolgt durch Angabe der Präzisionsmaße und der Vertrauensgrenzen. Sie lassen sich aus der Streuung der Einzelwerte innerhalb einer Dosisgruppe berechnen.

Die üblichen Variabilitätsmaße sind die Standardabweichung (s) und die Streuung (s^2). Statt dessen empfiehlt GADDUM das theoretisch ableitbare Präzisionsmaß λ bzw. dessen reziproken Wert L . Dieses hat den großen Vorteil, von Versuchsanordnung und Einheitsabgabe unabhängig zu sein und deshalb einen Vergleich verschiedener Methoden aus verschiedenen Laboratorien zu gestatten. Die Resultate sind umso präziser, je kleiner λ ist. Gute Bestimmungen erreichen λ -Werte von 0,1 bzw. L -Werte von 10,0; die zulässigen Grenzen liegen bei $\lambda = 0,4$ bzw. $L = 2,5$.

Jede biologische Bestimmung stellt letzten Endes nur eine Schätzung der tatsächlichen Aktivität dar, weshalb von vornherein ein Irrtumsrisiko von 5 % eingeplant wird. Dies soll besagen, daß bei mehrmaliger Ausführung desselben Testes ungefähr jede 20. Bestimmung erheblich vom Durchschnitt abweichen wird. Je geringer aber die Streuung der einzelnen Versuche ist, d.h. je enger die Vertrauensgrenzen beieinander liegen, desto genauer ist die Bestimmung.

B. DER IMMUNOLOGISCHE GONADOTROPINNACHWEIS

1. A l l g e m e i n e s

Der Gedanke, Proteohormone immunologisch nachzuweisen, stammt aus dem Jahre 1903 von LIEPMANN (86). Besonderes Interesse

wurde von jeher dem HCG entgegengebracht, da dessen Nachweis als Schwangerschaftstest von allgemeiner Bedeutung ist. Obwohl die Bildung eines spezifischen Antikörpers schon 1934 von THOMSON, COLLIP und SELYE (17) bewiesen wurde, scheiterte die klinische Anwendung der Nachweisreaktionen an der großen Zahl von Fehlergebnissen, die wiederum eine Folge der geringen Reinheit des Antigens HCG waren (BRODY und CARLSTRÖM, 25). Erst in neuester Zeit konnten HCG-Präparate hergestellt werden, die diesen Ansprüchen genügten. GOT u.a. (55) glauben, mit einem HCG-Konzentrat von 12000 I.U. pro mg eine immunologische Reinsubstanz dargestellt zu haben.

Ein weiteres Problem war das Sichtbarmachen der Antigen-Antikörper-Reaktion. Sie wurde in den letzten Jahren auf verschiedene Weise gelöst. BRODY und CARLSTRÖM (24) entwickelten eine Komplementbindungs-Reaktion und McKEAN (75) eine Gel-Präzipitation. Die Mehrzahl der erfolgreichen Hormon-Nachweis-Reaktionen, z.B. von Insulin durch AQUILLA und STAVITZKY (10 und 11), von STH durch READ und STONE (103) und LI u.a. (84) und von HCG durch WIDE und GEMZELL (127), gelangen aber mit der sogenannten Hämagglutinations-Verhinderungs-Methode.

2. Die Hämagglutinations-Verhinderungsreaktion zum HCG-Nachweis n. WIDE u. GEMZELL

a) Prinzip

Diese Reaktion beruht auf vier verschiedenen Erkenntnissen:

1. Ein Antigen (z.B. HCG) verbindet sich in einer Lösung

- fest mit einem vorhandenen Antikörper (z.B. HCG-Antiserum).
2. Eiweiß-Antigene lassen sich auf die Oberfläche von roten Blutkörperchen, die mit Gerbsäure vorbehandelt wurden, absorbieren. (Diese Reaktion wurde als "BOYDENS-Technik" (23) bekannt.)
 3. In isotonischer Lösung suspendierte Erythrozyten, auf deren Oberfläche Antigene absorbiert sind, setzen sich auf dem hemisphärischen Boden eines Reagenzglases in Form eines scharf umgrenzten Ringes ab. Bei Gegenwart von Antikörpern reagieren sie aber mit diesen und bilden nun einen feinen, gleichmäßigen Bodenbelag. (Hierbei wird allgemein von einer Agglutination gesprochen, obwohl es sich nicht um eine solche handelt.) Diese Entdeckung machte SALK (108) 1944 mit Influenza-Agglutinin.
 4. Die "Agglutination" kann durch Zugabe von antigenhaltiger Flüssigkeit (z.B. Schwangerenharn) verhindert werden, da diese Antigene die vorhandenen freien Antikörper absättigen, bevor sie mit den Erythrozyten reagieren.

Die breite klinische Anwendung des Testes wurde erst ermöglicht, als es gelungen war, die Erythrozyten durch Behandlung mit 3 % Formaldehyd über längere Zeit haltbar und sie zugleich für HCG-Antikörper aufnahmefähig zu machen (WEINBACH, 124).

Da zur Gewinnung von Antiserum nicht das schwer herstellbare immunologische Reinpräparat, sondern die Handelspräparate Pregnyl (Firma Organon, Holland) oder Gonadex (A.B. Leo, Schweden) verwendet wurden, traten zwangsläufig auch

unspezifische, gegen die Verunreinigungen des Präparats gerichtete Antikörper auf. Fehlreaktionen konnten einerseits dadurch verhindert werden, daß auf die Erythrozyten ein HCG-Präparat absorbiert wurde, welches verschieden war von demjenigen, das die Kaninchen als Antigen injiziert bekamen; andererseits gelang es, die unspezifischen Antikörper mit dem Urin von Nicht-Schwangeren zu neutralisieren (BRODY und CARLSTRÖM, 25).

b) Die Kreuzreaktion zwischen
HCG und hypophysärem ICSH
- Spezifität des Tests

Bei besonders großer Empfindlichkeit der Testsubstanzen fand WIDE positive Reaktionen auch außerhalb der Schwangerschaft, und zwar in der Mitte des normalen Zyklus und bei Frauen nach der Menopause (128). Das nachgewiesene Hormon mußte aus der Hypophyse stammen. Zur näheren Charakterisierung wurden verschiedene Hypophysenpräparationen immunologisch und biologisch erforscht; es zeigte sich nur bei der LH-Fraktion ein streng paralleles Verhalten beider Untersuchungsmethoden. Schon frühere Untersucher hatten gefunden, daß sich durch HCG-Antiserum der biologische Effekt von HCG aufheben läßt (BAUCHMANN, COLLIP und SELYE 1934, 17; TWOMBLY 1936, 121). Dabei fand TWOMBLY auch, daß ein biologisch inaktives HCG (erhitzt oder gealtert) ein Antiserum erzeugt, das biologisch aktives HCG zu neutralisieren vermag. Kreuzreaktionen zwischen HCG und LH mit HCG-Antiserum und LH-Antiserum, die mit verschiedenen serologischen Verfahren nachgewiesen wurden (WIDE, 127; KAIVOLA u.a., 74; BOURDEL und LI, 22; BUTT u.a., 35), bewiesen nun

die Annahme, daß im HCG und im LH die gleiche immunologisch reagierende Gruppe vorhanden ist. Immunologisch gleich aktive Präparationen von HCG und LH unterscheiden sich aber in ihrer biologischen Aktivität deutlich, und zwar zeigt das LH hierbei die 3-fache Aktivität des HCG-Präparates.

Auch in den verschiedenen Phasen der Schwangerschaft veränderte sich das Verhältnis von biologischer zu immunologischer Aktivität. Dies zeigt - ebenso wie die Tatsache, daß die biologische Aktivität durch Erhitzen zerstört wird, während die immunologische Aktivität erhalten bleibt -, daß die immunologisch reagierende Gruppe zur biologischen Wirkung zwar notwendig, aber nicht die allein wirksame ist. Möglicherweise handelt es sich bei dem biologisch inaktiven Hormon um eine Vorstufe oder ein Abbauprodukt des normalen HCG (WIDE, 127).

c) P r ä z i s i o n, G e n a u i g k e i t u n d E m p f i n d l i c h k e i t

Die Angaben dieser Größen für den Immuntest erfolgen aufgrund der Berechnungen von WIDE (127), der bei seinen Versuchen Substanzen benutzt hat, die den Bestandteilen des Pregnosticon-Testes der Firma Organon gleichzusetzen sind. Die Genauigkeit der Methode konnte durch Recoveries belegt und die Empfindlichkeit durch Vergleich mit Standardpräparaten bestimmt werden.

Präzision: Als kleinsten Verdünnungsschritt, bei welchem noch ein eindeutig ablesbarer Endpunkt vorhanden ist, gibt

WIDE die Stufe 1,12 : 1 ($\log 1,12 = 0,05$) an. In mehreren parallel angesetzten Verdünnungsreihen von derselben Substanz erhielt er eine geringfügige Variation des Endpunkts (z.B. 19-mal Endpunkt bei 1,0 i.E./ml und 1-mal Endpunkt bei 1,12 i.E./ml).

Bei einer Verdünnungsstufe von 2 : 1, die für eine hinreichend genaue Abschätzung der Aktivität im Urin für den Klinikbetrieb ausreicht, ist also nicht mit methodisch bedingten Fehlwerten zu rechnen. Eine genauere Abstufung der Ergebnisse läßt sich dadurch erzielen, daß die verschiedene Ringgröße in die Kalkulation einbezogen wird. Daß dies bis zu einem gewissen Grade möglich ist, zeigt die Erfahrung und der Vergleich mit fein abgestuften Standardkonzentrationen.

Nach READ und BRYAN (102) wird die Präzision der Ergebnisse mit der "Katzen-Methode" bestimmt. Das Prinzip dieser "direkten Bestimmung" (FINNEY, 52) beruht auf der eindeutigen Antwort auf eine bestimmte Konzentration der Testsubstanz und des Standards (z.B. darauf, daß eine Katze bei einer bestimmten Giftkonzentration stirbt oder daß die Hämagglutinationsreaktion von der Verhinderung zur kompletten Agglutination wechselt) und der Möglichkeit, diese Konzentration direkt zu messen (zit. nach WIDE, 127). Aus dem Durchschnitt von 64 Versuchen (Verdünnung 1 : 1,26), die jeweils 4-fach ausgefertigt waren, wurden von WIDE Standardabweichung und Vertrauensgrenzen ermittelt. Die Standardabweichung ergab sich zu $\log = 0,04$ und die Vertrauensgrenzen lagen für $P = 0,05$ bei 84 % bzw. 119 % des Numeruswertes.

Die weitere Berechnung von andersartigen Versuchsanordnungen

gen (z.B. Verdünnung 2 : 1 und einfache Ausfertigung) basierte auf diesen Ergebnissen.

Verdünnung	Unbek.Präp./ Standard	Stand.-Abweich. u.mittl.Fehler	Freiheits- grade	Vertrauens- grenzen
1 : 1,26	1/1	$\pm 0,075$	192	78% - 129%
	2/2	$\pm 0,040$	192	84% - 119%
	4/4	$\pm 0,028$	192	88% - 114%
1 : 2	1/2	$\pm 0,106$	19	60% - 166%

Tabelle B

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse bei verschiedenen Versuchsanordnungen (nach WIDE, 127).

Hierbei ist zu beachten, daß die relativ weiten Vertrauensgrenzen bei den Versuchen mit Verdünnung 2 : 1 nicht aus einer größeren Ungenauigkeit des Testes resultieren, sondern daraus, daß der Bereich, in dem die genau erfaßte Aktivität liegt, nicht durch weitere Verdünnungsschritte eingeengt wird.

Genauigkeit: Die Genauigkeit einer Versuchsanordnung gibt an, wie nahe ein ermittelter Wert an den tatsächlichen herankommt. Sie berücksichtigt also deren systematischen Fehler. Normalerweise wird sie durch Recoveries bestimmt. Der Nachweis einer bekannten Menge HCG aus Schwangerenurharn gelang WIDE im direkten Test (ohne Anreicherung) zu ca. 100 %.

Empfindlichkeit: Die Empfindlichkeit ist definiert als die geringste Menge der spezifischen Substanz (z.B. HCG), die durch die Versuchsanordnung nachgewiesen wird. Sie hängt in unserem Fall von der Menge des zugegebenen Antiserums und der Erythrozyten ab, ist aber im Pregnosticontest konstant.

Der Hämagglutinations-Verhinderungs-Test erlaubt zwar einen Nachweis von 0,005 i.E. pro 0,1 ml, er ist aber im Pregnosticon-Test zweckmäßigerweise so eingestellt, daß 0,08 - 0,1 i.E. pro 0,1 ml eine positive Reaktion verursachen. Um diese Agenzien zum Nachweis sehr geringer Hormonmengen verwenden zu können, ist eine vorherige Konzentration der Gonadotropine notwendig.

3. D e r P r e g n o s t i c o n - T e s t

Die Firma Organon, Holland, hat den von WIDE und GEMZELL entwickelten Schwangerschaftsnachweis in eine Form gebracht, die gegen äußere Einflüsse (Temperatur) und Veränderungen (Alterung, Menge der Testsubstanzen) weitgehend abgesichert ist und die Ausführung des Testes vereinfacht. Eine Packung enthält 4 Fläschchen trockengefrorener Erythrozyten und 2 Fläschchen Pufferlösung zu deren Suspendierung. Das ebenfalls lyophilisierte Antiserum befindet sich schon in Ampullen mit hemisphärischem Boden, die bei der Ausführung des Testes zugleich als Reagenzgläser dienen. Außerdem sind der Packung getrocknete Kontrollurine beigegeben, die je eine typisch positive bzw. negative Reaktion verursachen. Ein Reagenzglasständer mit Spiegelboden erleichtert das Ablesen der Reaktion.

Ausführung: Die Suspension der Erythrozyten erfolgt mit 4 ml der beigefügten Pufferlösung. In die Ampullen, die das trockengefrorene Antiserum enthalten, werden 0,1 ml der zu testenden HCG- oder LH-haltigen Flüssigkeit und 0,4 ml der Erythrozytensuspension pipettiert. Nach kurzem Schütteln

werden die Gläser an einem erschütterungsfreien Ort in den Spezialständer gestellt. Die positive oder negative Reaktion bildet sich innerhalb von 2 Stunden aus.

In Abänderung der Vorschrift kann man in manchen Fällen die Menge der zu untersuchenden Flüssigkeit verdoppeln (auf 0,2 ml), um eine möglichst geringe Menge von LH nachweisen zu können.

Die Menge der gesamten Flüssigkeit im Röhrchen hat nach WIDE keinen Einfluß auf das Ergebnis, solange sie zwischen 0,3 und 0,8 ml liegt. Lediglich die Ablesezeit verlängert sich von 45 Minuten bei 0,3 ml auf 3 Stunden bei 0,9 ml.

Nach Zugabe von 0,1 ml Testsubstanz beträgt das Flüssigkeitsvolumen im Röhrchen 0,5 ml und bei Zugabe von 0,2 ml 0,6 ml. Diese Volumenänderung hat also keinen Einfluß auf das Ergebnis.

III. SPEZIELLER TEIL. - EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A. ZUR METHODIK DES BIOLOGISCHEN TESTES

1. Vergleich des Gonadotropin - Hausstandards mit dem interna- tionalen Standardpräparat HMG 20 A

Entgegen der früher üblichen Angabe der gonadotropen Aktivität in Mäuse-Uterus-Einheiten (wobei 1 MUE definiert war als Dosis, die einen 2- bis 3-fachen Anstieg des Uterusgewichts eines infantilen Mäuseweibchens bewirkt), wurden die vorliegenden Ergebnisse auf das internationale Standardpräparat HMG 20 A bezogen, das nach dem LORAINÉ'schen Verfahren hergestellt wurde.

Der für unsere Bestimmungen verwandte Hausstandard wurde nach dem gleichen Verfahren aus dem Urin von Frauen in der Menopause, die eine hohe Gonadotropinausscheidung aufwiesen, hergestellt.

Anhand eines Vergleichs des Hausstandards mit dem Standard 20 A wird im Folgenden die rechnerische Auswertung des biologischen Testes beschrieben, wie sie auch für die Einzelbestimmungen zur Anwendung kam.

Berechnung der Aktivität von 1 und 2 mg des Hausstandards
(4 Tiere pro Dosis):

Präparat:	Unbekannt(Hausstandard)		HMG 20 A	
Dosis:	1 mg	2 mg	1 mg	2 mg
Uterusgewichte in mg:	1.M. 7,5 mg	44,0 mg	31,5 mg	57,0 mg
	2.M. 19,0 mg	16,5 mg	39,5 mg	55,0 mg
	3.M. 9,0 mg	36,5 mg	32,5 mg	41,0 mg
	4.M. 18,0 mg	27,5 mg	16,5 mg	50,0 mg
Summe	53,5 mg	174,5 mg	120,0 mg	203,0 mg
Durchschnitt	$U_1=13,4$	$U_2=31,1$	$S_1=30,0$	$S_2=50,8$
Spannweite	11,5	27,5	23	16

Vergleiche $U_2 + U_1 = 44,5$ $S_1 + S_2 = 80,8$

$U_2 - U_1 = 17,7$ $S_2 - S_1 = 20,8$

Regression E $= 1/2 (U_2 - U_1 + S_2 - S_1) = 1/2 (17,7 + 20,8)$
 $= 19,25$

Aktivitäts-
unterschied F $= 1/2 ((U_1+U_2) - (S_1+S_2)) = 1/2 (44,5-80,8)$
 $= -18,15$

Parallelität G $= (U_2-U_1) - (S_2-S_1) = 17,7 - 20,8 = -3,1$

Quotient benachbarter Dosen J $= 2 \text{ mg}/1 \text{ mg} = 2,0$

Abstand der Dosislog. I $= \log J = \log 2,0 = 0,301$

Regressionskoeff. b $= E/I = 19,25/0,301 = 64,0$

Abst. der Wirkungsgeraden M $= F/b = -18,15/64,0 = -0,284 = 0,761 -1$

Aktivitätsquotient R $= \text{antilog } 0,716 -1 = 0,52$

Vermutete Aktivität: 1 mg Hausstandard = 1 mg HMG 20 A

Tatsächliche Aktivität: 1 mg Hausstandard = $0,52 \times 1 \text{ mg HMG 20 A}$
 $= 0,52 \text{ E HMG 20 A}$

Streuungen: In allen Dosisgruppen wurden 4 Tiere verwendet.
Der zugehörige Faktor zur Schätzung der Standardabweichung

aus der Spannweite beträgt $f_4 = 0,486$ (FINNEY).

Anzahl der Dosisgruppen $S = k + k' = 2 + 2 = 4$

Durchschnittl. Spannweite $= (11,5+27,5+23,0+16,0)/4 = 19,5$

Standardabweichung $s = 19,5 \times f_4 = 9,48$

Reststreuung $s^2 = 9,48^2$

Freiheitsgrad $= S(n-1) = 12$

Streuung der Gruppendurchschnitte: $s^2/n = v = 4,74^2$

Streuung der Vergleiche $A = V = V(E) = V(F) = 4,74^2$

$$V(G) = 4V = 9,5^2$$

Streuung des Regressionskoeff. $V(b) = V(E)/I^2 = 248,0$

Gültigkeitskriterien

Für den Freiheitsgrad 12 ist der Tafelwert $t = 2,18$ (FINNEY)

1. Regression $g = t^2 \times V(b)/b^2 = 0,288$

2. Parallelität $t_1 = G/ V(G) = -0,326$

3. Gleiche Wirkung $t_2 = F/ A = -3,830$

Präzisionsmaße: $L = b/s = 6,740$

$$\lambda = s/b = 0,148$$

Vertrauensgrenzen

$$M_{o+u} = M/1-g \pm t/b(1-g) \times A(1-g) + M^2 V(b) = \pm 0,399 \pm 0,292$$

$$M_o = 0,893 -1 \quad R_o = 0,782$$

$$M_u = 0,309 -1 \quad R_u = 0,204$$

Obere Vertrauensgrenze $= 0,782 \times 1 = 0,782$ (E HMG 20 A)

Untere Vertrauensgrenze $= 0,204 \times 1 = 0,204$ (E HMG 20 A)

2. D a s T i e r m a t e r i a l

Der Wert des biologischen Testes steht und fällt mit der Qualität des verwendeten Tiermaterials. Für alle Tiere wurden in unserem Stall gleiche Bedingungen geschaffen, die Standardisierung erstreckte sich auf die Käfige, die Zahl der Mäuse pro Käfig, die Raumtemperatur und auf das Futter. Die Tiere gehörten dem Stamm NMRI an und waren bei Abschluß des Tests nie schwerer als 11,5 g. 2 Vortestierungen wurden mit einem anderen Stamm ausgeführt, die erhaltenen Uterusgewichte zeigten jedoch keine signifikante Abweichung. Die Uterusgewichte der Mäuse wurden absolut verwertet und nicht auf das Körpergewicht bezogen, weil die Umrechnung weder bei DISZFALUSY (42) noch bei uns Vorteile bot.

3. M e n g e u n d T o x i z i t ä t d e r E x t r a k t e

Die durchschnittlichen Extraktmengen betrugen bei Postmenopausenharn 132 mg/l und bei den Harnen amenorrhöischer Frauen 163 mg/l. Sie lagen damit etwas unter den von anderen Autoren gewonnenen Mengen (BUSCHBECK, 31; LORAINÉ und BROWN, 91).

Die durchschnittlichen ungereinigten Extraktmengen machten bei Amenorrhöen 507 mg/l und nach der Menopause in Übereinstimmung mit GÖRDES (54) 340 mg/l aus. Zufolge der gereinigten, relativ untoxischen Extrakte bewegte sich die Sterblichkeit der Mäuse normalerweise zwischen 2 und 5 %. Die Extraktmengen wurden mit den von anderen Autoren gefundenen verglichen (Tabelle I).

B. ZUR METHODIK DES IMMUNOLOGISCHEN TESTES

1. Voruntersuchungen für quantitative Gonadotropinbestimmungen mit den Agenzien des Pregnosticon-Testes

a) Standardisierung der Testsubstanzen und Abhängigkeit der Reaktionen vom Lösungsmittel

Der internationale HCG-Standard wurde als Vergleichsgrundlage für alle immunologischen Versuche benutzt; auf ihn wurde die Empfindlichkeit der Pregnosticon-Agenzien bezogen. Eine immunologische Einheit (I.E.) bedeutete definitionsgemäß - entsprechend der biologischen Festlegung - die immunologische Aktivität von 0,1 mg des Standardpräparates. Auch die immunologische Aktivität der im Harn enthaltenen hypophysären Gonadotropine wurde als HCG-Äquivalent in diesen Einheiten angegeben.

Die Ergebnisse der Standardisierung zeigen, daß der Pregnosticon-Test bei einer HCG-Konzentration von 0,8 E/ml = 800 E/l eine schwach positive, bei 1,2 E/ml = 1200 E/l eine stark positive Reaktion gibt (Tabelle III). Die feine Abstufung der Verdünnungen (1 : 1,26) gestattet zugleich den verschiedenen Ringgrößen bestimmte Gonadotropinkonzentrationen zuzuordnen. Die Verdünnungsreihe wird mit Männerharn angesetzt. Dies hat folgende Gründe: In dem verwendeten handelsüblichen HCG-Präparat Predalon/Organon mit 5000 IE/Ampulle konnte bei Lösung in Wasser oder Phosphatpuffer von pH 6,4 mittels des Immuntestes zunächst keine Aktivität nach-

gewiesen werden. Derselbe Befund ergab sich auch bei dem in Wasser oder Puffer gelösten HCG-Standard. Nun wurde dieselbe Verdünnungsreihe, einer Anregung von Prof. HOHLWEG folgend, mit Männerharn, der weniger als 10 IE/l enthielt, als Lösungsmittel angesetzt. Bei diesem Vorgehen konnten sowohl in den Predalon-Ampullen als auch im internationalen Standardpräparat die deklarierten Einheiten nachgewiesen werden, und zwar in Übereinstimmung mit der für den Pregnosticon-Test angegebenen Empfindlichkeit von 0,08 IE/0,1 ml. Demgegenüber hatte, wie aus der Tabelle II (Fälle 5a und 5b) zu ersehen ist, die Art des Lösungsmittels bei der Testierung eines von der Firma Organon hergestellten HMG-Präparats (Res. Prep. Nr. 3434) keinen Einfluß auf das Ergebnis. Auch bei der Testierung der Urin-Fällungen wurde kein Unterschied in den Reaktionen zwischen den in Wasser und den in Männerharn gelösten Extrakten beobachtet. Berücksichtigt man die weitaus größere Reinheit der HCG-Präparate gegenüber den Urinextrakten, so liegt der Schluß nahe, daß bei der HCG-Herstellung eine unspezifische Komponente verlorengegangen ist, die bei starken Verdünnungen die Empfindlichkeit des Tests beeinträchtigt. Ohne diese im Harn enthaltenen Komponente, die im Folgenden als "Aktivator" bezeichnet werden soll, wies der HCG-Standard-Test konstant erst bei 6-facher Konzentration eine positive Reaktion auf (vgl. Tabelle III Nr. 1 a+b und 2 a+b). Die übereinstimmenden Ergebnisse zwischen den Wasser- und Männerharn-Testierungen zeigten, daß der "Aktivator" bei den alkoholgefällten Urinextrakten und beim HMG 3434 noch vorhanden ist.

b) P r ü f u n g v e r s c h i e d e n e r P r e g n o s t i c o n - S e r i e n

Anhand eines geeigneten Substandards (HMG O. 3434) wurde jede neue Charge von Pregnosticon-Agenzien auf ihre Empfindlichkeit getestet. Lösen und Verdünnen des Substandards erfolgte immer in gleicher Weise mit Wasser oder Puffer.

Ergebnis: Wie aus Tabelle II ersichtlich ist, stimmten die einzelnen Pregnosticon-Serien in ihrer Empfindlichkeit sehr gut überein. Aufgrund dieses Ergebnisses muß nicht bei jedem quantitativen Test ein Vergleichstest angesetzt werden; es genügt, jede Charge auf ihre Empfindlichkeit zu prüfen und etwaige Abweichungen bei der Berechnung der Einheiten zu berücksichtigen. Für den Substandard HMG O. 3434 wurde eine Aktivität von 60 bis 70 IE LH/Ampulle als HCG-Äquivalent errechnet.

c) B e u r t e i l u n g d e r R i n g g r ö ß e n

Bei positivem Ausfall des Testes zeigten sich die ersten Andeutungen eines Ringes nach ca. 1 Stunde; nach 2 bis 3 Stunden war der Ring immer voll ausgebildet.

Die Größe der Ringe variierte von der zentralen Scheibe bis zum schmalen Randsaum. In aufeinanderfolgenden (2 : 1)-Verdünnungen war der Übergang von der positiven zur negativen Reaktion aber immer eindeutig innerhalb zweier Verdünnungsstufen abzulesen. Dabei traten die Bilder der Abbildung I auf.

Verdünnung:	1	1:2	1:4
1. Beispiel:	 = +++	 = ++	 = -
2. Beispiel:	 = +++	 = +	 = -
3. Beispiel:	 = +++	 = +	 = -

Abb.I: Beispiele für die Ringbeurteilung (in Anlehnung an WIDE).

WIDE bezeichnete die Ringe von +++ bis ++ als positiv und + als teilweise agglutinierte Zwischenstufe. Bei Verdünnungen von 1,26 : 1 ergaben sich immer mehrere positive Ringe mit zunehmendem Durchmesser, die bei der (2 : 1)-Verdünnung alle innerhalb von 1 1/2 Verdünnungsstufen lagen.

Die einzelnen Ringgrößen repräsentieren aufgrund von Vergleichen mit den einzelnen Verdünnungsstufen des HCG-Standards folgende HCG-Mengen bzw. LH-Äquivalente:

+++ = 1200 IE/l

++ = 1000 IE/l

+ = 800 IE/l

Zur Berechnung wurde immer jener Ring herangezogen, der unmittelbar vor der negativen Reaktion auftrat.

Die Versuche zeigten, daß die verschiedenen Ringdurchmesser mit einer solchen Konstanz auftreten, daß sie zur Auswertung der Ergebnisse herangezogen werden könnten.

Falsche positive Ergebnisse sind zu vermeiden, wenn die Ständer erschütterungsfrei aufgestellt werden; sonst formen sich

ungleichmäßige, gezackte, ein positives Resultat vortäuschende Ringe.

Nach mehr als 2 Stunden konnten die getesteten zentrifugierten und filtrierten Konzentrate durch Ausfällungen die Erythrozyten mitreißen und das Ergebnis verfälschen. Die primäre Ablesung nach 1 bis 2 Stunden war dadurch aber nicht beeinflußt.

d) A k t i v i t ä t s s c h w u n d i n U r i n u n d U r i n e x t r a k t

Gleiche Bedingungen für die Tests und deren Auswertung sind nur gegeben, wenn das Alter des Urins berücksichtigt wird. WIDE fand bei 4° C in seinen Urinproben einen Schwund von 13 % der ursprünglichen HCG-Aktivität nach 2 Tagen und von 23 % nach 6 Tagen. Bei -18° C stellte er keine Aktivitätsabnahme fest.

Nach 1, 3 und 7 bzw. nach 1, 3 und 9 Tagen ließ sich bei den eigenen Untersuchungen kaum ein Aktivitätsrückgang nachweisen. Von 3 Urinen (mit 30, 45 und 60 IE/l), die bei 4° C im Kühlschrank gelagert wurden, zeigte sich nach 3 Tagen noch kein Verlust, während er nach 7 Tagen ca. 10 % betrug. Die Extrakte von durchschnittlich 3 IE/ml waren nach 3 und 9 Tagen noch voll aktiv.

2. D i e A n r e i c h e r u n g s v e r f a h r e n

Da der Pregnosticon-Test auf den Nachweis von 800 bis 1000 IE/l eingestellt ist, mußte der Urin zur Erfassung von LH-

Konzentrationen bis zu 100 IE HCG-Äquivalenten entsprechend konzentriert werden.

Der Nachweis einer möglichst geringen Hormonmenge ist nur bei starker Konzentrierung der Testlösung möglich. Diese hängt im wesentlichen von 3 Faktoren ab:

1. von der Menge der Trockensubstanz, die gelöst werden muß;
2. von der Löslichkeit der Trockensubstanz bzw. von der Menge des unlöslichen Rückstandes;
3. von dem Gehalt an aktiver Substanz = Reinheit der Trockensubstanz.

a) Die Acetonfällung nach W I D E (128)

WIDE gab zur Herstellung von Konzentraten 1 vol. (= 50 ml) Urin mit 4 Vol. (= 200 ml) Aceton zusammen und stellte das Gemisch zur vollständigen Präzipitation eine halbe Stunde lang in den Kühlschrank. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert, mit (1 Vol.) Alkohol gewaschen, zentrifugiert, mit (1 Vol.) Aether gewaschen, nochmals zentrifugiert und an der Luft getrocknet; dann wurde es in einem Bruchteil des Ausgangsvolumens Phosphatpuffer aufgenommen, 20 Minuten zur besseren Lösung stehen gelassen, zur Abtrennung des unlöslichen Rückstandes zentrifugiert und filtriert.

Eine Überprüfung des Verfahrens zeigte folgende Ergebnisse (Tabelle IV und Abb. II):

Die durchschnittliche Fällungsmenge betrug 8420 mg/l bzw. 4940 mg/Tag, wobei nach Aufnahme in Puffer noch 3800 mg/l

bzw. 2520 mg/Tag unlöslichen Rückstandes (= 45,1 % der Fällung) verblieben. (Auch die Rückstände wurden vor der Wägung mit Alkohol und Aether gewaschen und getrocknet.) Bei den Präzipitaten handelte es sich überwiegend um eine gelblich-weiße, karamelartige Masse, welche am Glasboden klebte, sich schlecht mit Alkohol und Aether waschen ließ und infolgedessen nur sehr langsam trocknete. Im Puffer löste sie sich nur teilweise und langsam auf. Weder durch Zentrifugieren noch durch Filtrieren ließ sich eine klare Flüssigkeit abtrennen. Da mit dieser Methode also nur eine mäßig reine Testlösung zu gewinnen war, zeigten die Ringe oft schon nach kurzer Zeit eingefallene Ränder. Nach 3 bis 5 Stunden hatte sich meist eine falsch positive Scheibe gebildet. Das Ergebnis mußte deshalb nach 1 und nach 2 Stunden kontrolliert werden.

Die Tabelle Va gibt die Ergebnisse von 3 Recoveries wieder: 1/10 bzw. 1/5 des Ampulleninhaltes des Substandards HMG O. 3434 wurden in jeweils 50 ml Phosphatpuffer oder Männerharn gelöst und um das 10- bzw. 20-fache konzentriert. Die Recoveries erbrachten in jedem Fall eine Ausbeute, die ziemlich genau 50 % des gleichzeitig angesetzten Kontrolltestes ausmachte.

b) Die Kaolinadsorption nach LORAINÉ und BROWN

Diese Methode, die zur Gewinnung der Extrakte für den biologischen Test benutzt wurde (Abschnitt II. A, 3), ergab eine geringe Menge teilweise löslicher Substanz, und ermöglichte somit eine starke Konzentrierung für die immuno-

logische Testierung. In 2 Versuchen war mit den Kaolinenextrakten kein positives Ergebnis zu erzielen. Das ungereinigte Kaolinadsorbat ergab aber erst bei 2-facher Konzentration wie bei der im Folgenden beschriebenen Alkoholfällung dieselbe positive Reaktion.

In Anbetracht dessen, daß diese Methode sehr kompliziert und zeitraubend ist und bei ihrer Anwendung nur eine relativ geringe Aktivität resultiert, wurde sie für weitere Untersuchungen nicht mehr herangezogen.

c) Die einfache Alkoholfällung

Eines der ältesten Fällungsmittel für Gonadotropine ist der Äthylalkohol (ASCHHEIM und ZONDEK, 15; HELLER, 60). Zunächst wurden Versuche mit einer Fällung mit 5-fachem Volumen Alkohol aus unverändertem und angesäuertem Urin (pH 5,0) durchgeführt (Tabelle VI und Abb. III).

Die Alkoholfällung ergab nur selten ein klebriges, meist weißes Pulver, das sich mit Alkohol und Äther verhältnismäßig gut waschen ließ. Die Testlösung war nach Zentrifugieren und Filtrieren nur noch leicht getrübt, manchmal sogar ganz klar.

Die durchschnittliche Gesamtfällung betrug 5620 mg/l bzw. 4940 mg/24 Std., wobei nach Aufnahme im Puffer immer noch ein unlöslicher Rückstand von 2420 mg/l bzw. 2120 mg/24 Std. (43 % der ursprünglichen Fällung) zurückblieb.

Bei dieser Methode traten erst nach 1 Tag und nur bei relativ starken Konzentrationen falsch positive Ringe auf. In der üblichen Zeit von 2 bis 3 Stunden waren die Test-

Lösungen zur immunologischen Bestimmung aber brauchbar.

Die 3 Recoveries mit dieser Methode (Tabelle Vb) wurden variiert wie jene bei der Acetonfällung. Aus dem Puffergemisch war nur verhältnismäßig wenig Hormon wiederzugewinnen. Als maßgebend müssen aber die beiden Harn-Recoveries angesehen werden, die einen Aktivitätsnachweis von ca. 90% erbrachten.

d) Die Alkoholfällung mit Reinigungsschritt

α) Methode

LORAINÉ, JOHNSEN, ALBERT u.a. wandten bei verschiedenen Gonadotropinextraktionen pH-Verschiebungen zur Änderung der Löslichkeit von Eiweißkörpern an (d.h. zur Fällung in der Nähe ihres isoelektrischen Punktes).

Dieses Vorgehen wurde in der vorliegenden Arbeit auch auf die Alkoholfällung übertragen. Gleichzeitig erfolgte eine Mengen- und Aktivitätsbestimmung der Fällungen bei Zugabe verschiedener Volumina Alkohol.

Nach mehreren Voruntersuchungen kam folgende Versuchsreihe zur Durchführung:

Der Inhalt von 6 1/4 Ampullen HMG 3434 mit einer Gesamtaktivität von ca. 425 IE wurde in 250 ml Männerharn von bekannter Aktivität (< 7 IE/l) aufgelöst und zu je 50 ml in 5 Bechergläser aufgeteilt. Es folgte nun die Einstellung dieser Modellharn auf die pH-Werte 3,0, 5,0, 7,0, 9,0 und 11,0; dazu kam zu jeder Portion das gleiche Volumen (50 ml) Alkohol. Die entstandenen Fällungen wurden abzentrifugiert,

mit Alkohol und Aether gewaschen, getrocknet, gewogen, in 5,0 ml Puffer gelöst und auf ihre immunologische Aktivität geprüft. Die Überstände wurden noch 2-mal mit je 2 weiteren Volumen absoluten Alkohols in gleicher Weise gefällt. Von jeder pH-Stufe standen also sowohl die Menge als auch die Aktivität der Präzipitate mit 1 Vol., 3 Vol. und 5 Vol. absoluten Alkohols zur Verfügung. Die Aktivität der einzelnen Fällungen wurde sowohl in IE als auch prozentual zur insgesamt vorhandenen Aktivität angegeben (Tabelle VII und Abb. IV).

Durch Zugabe von 1 Vol. Alkohol bei pH 11 entstand ein beträchtlicher Niederschlag, der jedoch nur einen minimalen LH-Gehalt aufwies. Im sauren Bereich (pH 5,0) und bei Zugabe von weiteren 4 Vol. Alkohol wurde demgegenüber eine Gonadotropinfällung mit maximaler Aktivitätsausbeute erreicht, was der Gipfel der 5-Vol.-Kurve bei pH 5,0 graphisch zeigt. Daraus ergibt sich folgende Arbeitsvorschrift:

1. Fällung

50 bzw. 100 ml des 24-Std.-Sammelharns auf pH 11 einstellen,

1 Vol. (50 bzw. 100 ml) absoluten Alkohol zugeben,

30 Minuten bei 4° C stehen lassen,

zentrifugieren (ca. 3000 U/Min. 10 Min. lang),

Sediment verwerfen.

2. Fällung

Überstand auf pH 5,0 einstellen,

4 Vol. (200 bzw. 400 ml) absoluten Alkohol zugeben,

30 Minuten bei 4° C stehen lassen,

zentrifugieren, Überstand abgießen,

aktives Sediment mit 10 ml absoluten Alkohol waschen,
 zentrifugieren, waschen mit 10 ml Aether, trocknen,
 lösen in 1 ml Phosphatpuffer pH 6,4,
 10 Minuten stehen lassen, zentrifugieren, filtrieren.

Das so erhaltene Konzentrat wird nun im Pregnosticon-Test auf seine Aktivität geprüft. Dazu dienen Verdünnungsreihen, die je nach verfügbarem Konzentrat mit 0,5 ml oder 0,2 ml Phosphatpuffer im Verhältnis 2 : 1 angesetzt werden.

Das Röhrchen mit dem unverdünnten Konzentrat erhält die Bezeichnung 0), die erste Verdünnung die Bezeichnung 1), die zweite 2) usw. Für die Berechnung der Aktivität gilt das letzte positive vor einem eindeutig negativen Röhrchen der Verdünnungsreihe. Dabei wird folgende einfach ableitbare Formel angewendet:

$$X \text{ (IE/24 Std.)} = (1/k) \cdot 2^n \cdot r \cdot l$$

n = Nummer des Röhrchens mit dem letzten positiven Ring

k = Konzentration

r = je nach Ringgröße eingesetzte IE/l

(+ = 800, ++ = 1000, +++ = 1200)

l = Menge des 24^h-Urins in Litern.

Beispiel: Urinmenge = 0,8 l/24^h; Konzentrierung 50 : 1,
 Röhrchen 3) noch positiv, also r = 800;

$$\text{also: } X = (1/50) \cdot 2^3 \cdot 800 \cdot 0,8 = 102,0 \text{ IE/24}^h$$

Es hat sich als zweckmäßig erwiesen, bei der Testierung eines unbekannten Präparates zunächst jeweils eine Konzentrationsstufe zu überspringen und nach ca. 2 Stunden, wenn sich ein Ergebnis abgezeichnet hat, zur genauen Bestimmung des letztpositiven Ringes die entsprechende fehlende Ver-

dünnungsstufe einzuschleiben. Auf diese Weise ist es möglich, mit durchschnittlich 4 Röhrchen pro Versuch auszukommen. Wenn bei einem Versuch 0,1 ml unverdünntes Konzentrat kein positives Ergebnis brachte, wurde der Test mit 0,2 ml, in wenigen Fällen sogar mit 0,4 ml des Konzentrates angesetzt oder der Nativurin stärker konzentriert (100 : 1).

Die geringste nachweisbare Menge an LH beträgt also bei 1 l Tagesurin, einer Konzentration von 100 : 1 unter Verwendung von 0,2 ml Testlösung:

$$X = (1/100) \cdot 2^{-1} \cdot 800 \cdot 1,0 = \underline{4,0 \text{ (IE/24 Std.)}}$$

β) B e m e r k u n g e n z u m V e r f a h r e n

Die Tabelle VIII und Abb. V geben die Fällungsmengen wieder, die mittels obiger Methode erreicht wurden. Durch den Reinigungsschritt konnte von durchschnittlich 5258 mg Extrakt/l (28 Untersuchungen) eine inaktive Verunreinigung von 2657 ml/l = 50,5 % abgetrennt werden. Das aktive Präzipitat war gut löslich, es verblieb ein durchschnittlicher Rückstand von 19,1 % der aktiven Fällung (= 9,5 % der Gesamtfällung). Die inaktive Fällung war stets schwammig und trocknete nach Waschen mit Alkohol und Aether nur langsam; demgegenüber trocknete die aktive Substanz sehr schnell zu einem weißen Pulver, das sich bei einer Konzentration bis 50 : 1 fast vollständig löste. Nur bei stärksten Konzentrationen (100 : 1 und 200 : 1) verblieben größere Rückstände. Die Fällungen bei pH 11 und 1 Vol. Alkohol wurden wiederholt auf ihre Inaktivität geprüft. Bemerkenswert ist das übereinstimmende Ergebnis bei wiederholten Extraktionen aus demselben Urin (Nr. 48 a, b, c und Nr. 57 a, b in Tabelle VIII), wobei jedesmal ungefähr gleiche Extraktmengen bei gleichen Fällungs-

stufen erzielt wurden.

Mit dieser Fällungsmethode bildeten sich nie falsche positive Ringe, im Gegensatz zu manchen parallel angesetzten Aceton- und einfachen Alkoholfällungen.

Die Ergebnisse der 4 angefertigten Recoveries sind in Tabelle V zusammengestellt. 0,1, 0,2, 0,4 und 0,5 Ampulleninhalte des Substandards HMG O. 3434 wurden in jeweils 50 ml Männerharn gelöst und hieraus 20-fach konzentriert. 3 Recoveries wurden mit ihren zugehörigen Kontroll-Lösungen im Verhältnis 2 : 1 verdünnt, ein weiterer mit der Verdünnungsstufe 1 : 1,26 ($= 10^0 : 10^{0,1}$). Die Größe der Ringe stimmte bei den entsprechenden Verdünnungsstufen in jedem Versuch genau miteinander überein, was auf eine nahezu 100%-ige Wiedergewinnung des Hormons schließen läßt.

C. BESTIMMUNG DER GONADOTROPINAUSSCHIEDUNG MIT BIOLOGISCHER UND IMMUNOLOGISCHER METHODE BEI FRAUEN NACH DER MENOPAUSE

Bei 15 Frauen nach der Menopause wurde die Gonadotropinausscheidung biologisch und bei 11 davon gleichzeitig immunologisch bestimmt. Die Ergebnisse dieser Bestimmungen sind in Tabelle IX und Abb. VI nach dem zeitlichen Abstand von der Menopause angeordnet.

Bei den biologisch gefundenen Werten ist ein Absinken der Gonadotropinproduktion mit zunehmendem Alter zu erkennen. Der Mittelwert von 45,1 E HMG 20 A/24 Std. aus 15 Bestimmungen liegt etwas unter dem Durchschnitt, den andere Auto-

ren errechnet haben; so geben BROWN (28) 72,9 E und GÖRDES (54) 67,8 E an. Die kleinste gefundene Gonadotropinmenge betrug 5,6 E, die größte 105,0 E HMG 20 A/24 Std.

Die immunologisch bestimmten Werte schwankten von 27,0 IE bis 80,0 IE um einen Mittelwert von 46,2 IE/24 Std. Sie zeigten einen Anstieg mit zunehmendem Alter.

Als mittlere Tagesausscheidung in der Zeit von 1 bis 5 Jahren nach der Menopause ergaben sich 56,7 E HMG 20 A/24 Std. (7 Bestimmungen) bzw. 39,2 IE/24 Std. (7 Bestimmungen), in der Zeit von 6 bis 19 Jahren 43,6 E HMG 20 A/24 Std. (6 Bestimmungen) bzw. 59,0 IE/24 Std. (4 Bestimmungen). Bei 2 Frauen, deren Menopause schon über 20 Jahre zurücklag, fanden sich im Mittel nur noch 9,6 E HMG 20 A/24 Std.

Die Diskriminierungsindices wiesen infolgedessen in der Postmenopause kein konstantes Verhalten auf; sie schwankten zwischen den Werten 0,38 und 2,66. Abgesehen von den stark abweichenden Fällen Nr. 5 und 6 (2,34 und 2,66) betrug der durchschnittliche Diskriminierungsindex von 9 Fällen $\neq 0,84$ mit einer mittleren Abweichung von $\pm 0,29$.

D. BESTIMMUNG DER GONADOTROPINAUSSCHIEDUNG MIT BIOLOGISCHER UND IMMUNOLOGISCHER METHODE BEI FRAUEN MIT AMENORRHOEN

Der Hauptteil der untersuchten Frauen mit Amenorrhoe schied weniger als 15 E HMG 20 A/24 Std. aus.

Nur wenige Frauen wiesen einen eindeutig hypergonadotropen Zustand auf. Die Ergebnisse von 47 biologischen Bestimmun-

gen bei 38 verschiedenen Frauen verteilt sich wie folgt (sh. auch Tabelle X a + b und Abb. VII a + b):

Gruppe 1: unter 15 E HMG 20 A:

29 Untersuchungen von 25 Frauen, Mittelwert 5,0 E HMG 20 A, Minimalwert 1,05 E HMG 20 A/24 Std.

Gruppe 2: 15 bis 35 E HMG 20 A:

9 Untersuchungen von 8 Frauen, Mittelwert 21,0 E HMG 20 A.

Gruppe 3: über 35 E HMG 20 A:

9 Untersuchungen von 5 Frauen, Mittelwert 75,6 E HMG 20 A, Maximalwert 120 E HMG 20 A.

Die immunologische Bestimmung des LH-Gehaltes der Urine zeigte eine gewisse Parallelität zu den biologischen Werten der Gesamtgonadotropine. So entsprach der Quotient IE/E HMG 20 A für 18 Parallelfälle einem durchschnittlichen Diskriminierungsindex von 1,32 mit einer mittleren Abweichung von $\pm 0,42 = 32,1 \%$.

Wurden die Diskriminierungsindices für die Fälle mit eindeutig erhöhter Gonadotropinausscheidung getrennt von den anderen berechnet, so zeigte sich folgendes:

Für 11 eindeutige Parallelfälle aus der Gruppe 1 und der Gruppe 2 betrug der mittlere Diskriminierungsfaktor 1,58 $\pm 0,31$ ($= \pm 19,5 \%$), während er für die hypergonadotropen Fälle der Gruppe 3 mit 0,97 $\pm 0,28$ ($= \pm 29,7 \%$) bedeutend niedriger lag. Die Verringerung des Diskriminierungsindex, d.h. die Verschiebung des Verhältnisses IE/E HMG 20 A bedeutet möglicherweise eine verhältnismäßige Verringerung des LH-Gehaltes der Urine gegenüber deren Gesamtgonadotropingehalt.

Den beschriebenen 3 Gruppen von amenorrhoeischen Patientinnen mit einer Gesamtgonadotropinausscheidung von

1. bis 15 E HMG 20 A/24 Std.,
2. 15 bis 35 E HMG 20 A/24 Std.,
3. über 35 E HMG 20 A/24 Std.

entsprachen immunologisch gemessene Grenzen von

1. bis 20 IE/24 Std.,
2. 20 bis 40 IE/24 Std.,
3. über 40 IE/24 Std.

18 Untersuchungen bei 16 Frauen der Gruppe 1 ergaben einen Mittelwert von 8,9 IE/24 Std., 5 Untersuchungen bei 4 Frauen der Gruppe 2 26,8 IE/24 Std. und 3 Untersuchungen bei 3 Frauen der Gruppe 3 76,0 IE/24 Std.

In keinem Fall betrafen die biologisch und immunologisch bestimmten Gonadotropinausscheidungen einer Frau verschiedene Gruppen, so daß also für diese Fälle dieselbe Klassifizierung der Amenorrhoe mit beiden Verfahren möglich ist.

Von mehreren Patientinnen wurde im Abstand von 3 bis 6 Monaten eine zweite Gonadotropinbestimmung durchgeführt (Tabelle XI). Dabei zeigte sich, daß die Ergebnisse mit einer Ausnahme (Fall 34 bzw. 39) ungefähr von derselben Größenordnung waren und den üblichen Tagesschwankungen entsprachen.

IV. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

1.

Nach DICZFALUSY und HEINRICHS (38) handelt es sich bei der biologischen Bestimmungsmethode nach LORAINE und BROWN (89) und LEVIN und TYNDALE (83) zwar um eine einfache und empfindliche, aber weder für FSH noch für LH (ICSH) spezifische Methode. Mit ihr wird vielmehr die gesamte Gonadotropinaktivität biologisch gemessen.

Die Verunreinigung der Extrakte durch unspezifische, toxische Eiweißstoffe, die nach WALTER und WEPOCHI (123) die Wirksamkeit von Gonadotropinen beeinflussen, kann mit der Tricalciumphosphat-Reinigung, die hier in jedem Falle angewandt wurde, auf ein erträgliches Maß reduziert werden.

Die Gewichte der Harnextrakte lagen durchwegs unter den von anderen Autoren gefundenen (31, 91), was auf eine relativ große Reinheit schließen läßt.

Der Vergleich des Hausstandards mit dem internationalen Gonadotropin-Standard HMG 20 A lieferte eine Eichkurve, die gut mit derjenigen übereinstimmte, die LORAINE bei seinen Bestimmungen immer wieder gefunden hatte (92), so daß die vorliegenden Werte mit denen aus anderen Laboratorien vergleichbar sind.

Wie die unterschiedlichen Ergebnisse wiederholter Testierungen desselben Extraktes bei verschiedenen Autoren (38, 39, 41, 42, 43) zeigen, muß der methodische Fehler der biologischen Gonadotropinbestimmung relativ hoch veranschlagt werden.

2.

Von den Methoden zur Anreicherung immunologisch aktiver Substanzen, die größtenteils parallel an gleichen Urinen erprobt wurden, ließen sich mit der Acetonfällung ca. 50 % und mit der einfachen Alkoholfällung 80 bis 100 % der Aktivität der hier erprobten Alkoholfällungsmethode mit Reinigungsschritt erreichen.

In nachfolgender Tabelle C sind die durchschnittlichen Fällungsmengen dieser Methoden miteinander verglichen.

Fällungs- methode	Zahl d. Best.	Aktive Fällung mg/100 ml	%	Unlös- Rückstand mg/100 ml	%	Mittlere Konzent- ration	Recovery
Aceton	9	704,0 (370 - 1280)	100	380,0 (143 - 540)	54,0	20:1	50 %
Alkohol	14	562,4 (350 - 768)	79,8	242,6 (150 - 348)	34,5	40:1	80 - 100 %
Alkohol mit Rei- nigung	28	260,1 (138 - 560) (525,8*)	37,0	49,7 (8 - 110)	7,07	80:1	100 %

Tabelle C

Vergleich der Fällungsmengen mit der Aceton-, Alkohol- und Alkohol-Fällung mit Reinigungsschritt. Die Prozentangaben beziehen sich auf die mittlere Aceton-Fällungsmenge.

* = Menge der gereinigten Fällung + inaktive Fällung.

Die inaktiven Fällungen der 3 Methoden verhalten sich wie 100 : 79,8 : 37,0. Von den 37,0 % der gereinigten Alkohol-Fällung verbleibt nach Auflösen in Puffer noch ein Rückstand von 7,0 %. Die einfache Alkohol-Methode ergibt eine Fällungs-

menge, die der Summe aus dem aktiven und abgetrennten inaktiven Anteil der Alkoholfällung mit Reinigungsschritt ungefähr entspricht. Es wird also durch die Einstellung auf pH 11 nicht eine zusätzliche Verunreinigung ausgefällt.

Die Alkoholfällung mit Reinigungsschritt erfordert zwar einen etwas größeren Aufwand als die beiden anderen Methoden, er fällt aber praktisch kaum ins Gewicht. Die pH-Werte müssen annähernd genau eingestellt werden. Die zulässigen Grenzen sind 4,0 bis 5,5 bzw. 10,0 bis 11,5. Es empfiehlt sich, im alkalischen Bereich den pH-Wert von 11,5 nicht zu überschreiten, da LORAINÉ (89) jenseits dieser Grenzen eine Inaktivierung der biologischen Gonadotropine nachgewiesen hat. Ob eine Inaktivierung der immunologisch aktiven Gruppen stattfindet, wurde nicht überprüft.

Das Heranziehen der Ringgröße für die Berechnung des Ergebnisses beim Immuntest ist deshalb gerechtfertigt, weil sie in wiederholten Versuchen mit fein abgestuften Hormonkonzentrationen eine gleichbleibende Gesetzmäßigkeit zeigte. Die Festlegung des letzten positiven Ringes bei fein abgestuften Verdünnungsreihen beruht nämlich genauso auf der Beurteilung der Ringgröße, da sich hierbei der Wechsel von positiver zu negativer Reaktion auch auf mehrere Röhrchen verteilt und somit eine Sache exakter Definition und Erfahrung ist. Als Ablesezeit haben sich 1 1/2 Stunden nach Ansetzen des Testes als günstig erwiesen, da hier noch keine Verformung des Ringes durch eventuelle Verunreinigungen auftritt.

Bei der immunologischen Testierung hochgereinigter, in Was-

ser oder Phosphatpuffer gelöster HCG-Präparate (HCG-Organon und HCG-Standard) konnte überraschenderweise nur ca. $1/6$ der von der Firma angegebenen Einheiten gefunden werden. Nach Lösung derselben Substanzen in Männerharn ließen sich die erwarteten Gonadotropinmengen exakt nach ihren Einheiten nachweisen. Dieses Phänomen wurde zunächst mit einem nicht näher definierten "Aktivator", der in Nativurin zugegen ist und zur Aufrechterhaltung der Empfindlichkeit des Testes bei starken Verdünnungen nötig zu sein scheint, erklärt. Das Wesen des "Aktivators" ist bislang noch unbekannt. Es könnte sich dabei um unspezifische Substanzen handeln, die bei der Aktikörperbildung eine Rolle spielen und bei der immunologischen Reaktion unspezifische Stellen des Antigens absättigen, so daß eine größere Menge des spezifischen ICSH-Antigens zur entscheidenden Reaktion übrig bleibt.

Möglicherweise sind hiermit auch die hohen Werte für die Ausscheidung in Zyklus und Menopause zu erklären, wie sie WIDE zu einer Zeit angab, als das Phänomen des "Aktivators" noch nicht bekannt war. Vergleicht man nämlich eine Verdünnungsreihe aus unbekanntem Urin mit einer Verdünnungsreihe des HCG-Standards im Puffer, so ergibt erst die etwa 6-fache HCG-Standard-Konzentration dasselbe Ergebnis wie das HCG im Harn. Es scheint deshalb das 6-fache der tatsächlichen Menge HCG in dem unbekannten Urin vorzuliegen.

Die für die immunologischen Einheiten angegebenen Vertrauensgrenzen sind das Ergebnis ausgedehnter Untersuchungen von WIDE (128). Sie wurden berechnet für eine Abstufung der Verdünnungsreihe von 2 : 1 bei einfacher Ausführung des Testes und betrugen 60 bis 166 % des ermittelten Wertes.

Es steht außer Zweifel, daß durch Einbeziehung der Ringgröße eine präzisere Angabe der Aktivität erzielt werden konnte, als es die 2 : 1-Verdünnungsreihe normalerweise zuläßt. Die Vertrauensgrenzen entsprechen demnach mindestens denjenigen einer Verdünnungsabstufung von 1,58 : 1, welche WIDE zu 80 bis 125 % errechnet hatte.

Die Angabe der Vertrauensgrenzen, wie sie für 2 : 1-Verdünnungen berechnet worden sind, resultieren daraus, daß die Beurteilung der Ringgröße nicht mathematisch genau erfolgen kann, also von der Erfahrung des Auswerterers abhängt und somit möglicherweise einer Fehldeutung unterliegt. Insgesamt ist die Methode deshalb als "semiquantitativ" zu bezeichnen. Falsche positive Ringe wurden bei der vorgeschlagenen Alkoholfällung mit Reinigung aber nicht beobachtet.

Da sich die Agenzien des Pregnosticon-Testes als sehr konstant erwiesen haben, kann auf einen Vergleichstest mit bekannten Konzentrationen verzichtet werden. Hier wurde aber trotzdem jede neue Charge mit einem Hilfsstandard verglichen und jedesmal dasselbe Ergebnis erhalten.

Der Pregnosticon-Test scheint sich in Verbindung mit dem hier entwickelten Anreicherungsverfahren zur Klassifizierung einer Amenorrhoe zu eignen. Sein wesentlicher Vorteil gegenüber der biologischen Bestimmung liegt in der einfacheren Ausführung und vor allem in dem großen Zeitgewinn. Das Ergebnis des Immuntestes liegt nach ca. 3 Stunden vor, während der Tiertest mindestens 1 Woche in Anspruch nimmt.

Zur einheitlichen Beurteilung und Vermeidung von Fehlschlüssen wurden die ermittelten Gonadotropinausscheidungen in

IE/24 Std. angegeben. Im Gegensatz dazu bezieht WIDE seine Ergebnisse auf ein konstantes Volumen (1 Liter).

3.

Der Pregnosticon-Test wurde zur Schwangerschaftsdiagnose als Nachweisreaktion für HCG entwickelt. Als Zufallsbefund ergab sich eine Kreuzreaktion mit hypophysärem LH, das in Nichtschwangeren-Urin ausgeschieden wird.

Die molekulare Verwandtschaft dieser beiden Hormone konnte auch durch elektrophoretische Aufspaltung gesichert werden, wobei einzelne Spaltprodukte gleiche biologische Aktivitäten aufwiesen (126, 46, 111).

Die Tatsache, daß immunologisch gleich aktive Mengen von LH (ICSH) und HCG biologisch im Aktivitätsverhältnis $\text{LH} : \text{HCG} = 3 : 1$ reagieren (WIDE, 127), läßt sich auf verschiedene Weise erklären: LH und HCG können den antigenwirksamen Teil entweder in verschiedenem Verhältnis besitzen, oder es sich in beiden Molekülen Gruppen vorhanden, welche die biologische Wirkung verschieden beeinflussen. WIDE (127) hat nachgewiesen, daß die biologische Aktivität verschiedener HCG- und ICSH-Präparate parallel zur immunologischen Aktivität derselben Präparate verläuft. Der quantitative Pregnosticon-Test gibt also genau den Gehalt eines Stoffes an LH an, allerdings in immunologischen HCG-Äquivalenten.

4.

Zu den bei Amenorrhoeen ausgeschiedenen Gonadotropinen fand BROWN (27) ein konstantes Verhältnis zwischen Gesamtgonadotropin und FSH. Für das Verhältnis Gesamtgonadotropin zu ICSH liegen vorerst noch keine Untersuchungen vor.

Eine ähnliche Konstanz der Zusammensetzung geben mehrere Autoren (LOHSTROH, 93; ALBERT, 2, 4, 6, 8; KOVERCIC und LORAINÉ, 79; u.a.) auch für das Gonadotropin der Postmenopause an, während das Verhältnis Gesamtgonadotropin zu FSH innerhalb eines Zyklus bei BROWN (27) zwischen 1 : 0,45 und 1 : 2,38 schwankt. BUCHHOLZ (30, 31, 32) und McARTHUR (13) fanden dagegen im Zyklus weitgehend parallele Aktivitätskurven für Gesamtgonadotropin und ICSH.

Trotz der verschiedenen Anreicherungsverfahren ist für die biologischen und immunologischen Methoden bei einer konstanten Zusammensetzung des Gonadotropinkomplexes auch ein konstantes Verhältnis zwischen den erhaltenen biologischen und immunologischen Einheiten zu erwarten.

Die eigenen Ergebnisse zeigen einen Diskriminierungsfaktor von $1,32 \pm 0,42$ als Mittelwert aller Amenorrhoeen. Dieser Faktor erhöhte sich bei isolierter Bestimmung für alle Amenorrhoeen mit niedriger Hormonausscheidung (Gruppe 1 und 2) auf $1,58 \pm 0,30$, während er sich für die eindeutig hypergonadotropen Fälle auf $0,98 \pm 0,28$ verringerte. Dabei verringerten sich auch die mittleren Abweichungen, so daß auf eine unterschiedliche Zusammensetzung des Gonadotropinkomplexes in diesen verschiedenen Situationen geschlossen werden kann. Möglicherweise beruht die Änderung des Faktors aber auf der geringen

Zahl von Fällen (3), aus denen er berechnet wurde.

Der Diskriminierungsindex von $1,12 \pm 0,72$, der sich aus den Untersuchungen der Postmenopausenurine ergab, kann wegen der großen relativen Abweichung nur mit Vorbehalt beurteilt werden. Er resultiert entweder aus einer unhomogenen Zusammensetzung des Postmenopausengonadotropins oder aus Schwankungen der biologischen Bestimmung.

Bei Betrachtung der Amenorrhoe-Werte fällt die große Zahl der Fälle mit relativ niedriger Gonadotropinausscheidung auf. Vergleichbare Ergebnisse liegen aber auch bei RIUSECK (106) und STÄMMLER (114) vor, die ebenfalls überwiegend hypogonadotrope Zustände bei 30 bzw. 98 untersuchten sekundären Amenorrhoeen fanden.

Die Abgrenzungen von hypo-, normo- und hypergonadotropen Funktionszuständen des Hypophysenvorderlappens ist noch ziemlich willkürlich. Sie werden von verschiedenen Autoren unterschiedlich angegeben. Sie geschehen am zweckmäßigsten durch Orientierung am normalen Zyklus. Als normal sollte dabei noch eine Ausscheidung gelten, die ungefähr die Höhe des Zyklusgipfels aufweist, welcher bei ca. 20 bis 30 E HMG 20 A liegt (BROWN, 27; BUTT, 36; LORAINE, 90, 92; JOHNSEN, 68; KAISER u.a., 73). Therapeutisch ist es vor allem wichtig, die hypergonadotrope Form von den normogonadotropen und hypogonadotropen Formen abzugrenzen. Eine Substitution mit Gonadotropinen verspricht nur dann einen Erfolg, wenn im Organismus der Hormonspiegel nicht schon endogen erhöht ist, sondern die Amenorrhoe auf einem Gonadotropinmangel beruht (BETTENDORF, 18; DÖRNER und DAUME, 44). BETTENDORF (18) zieht z.B. die Grenze zu den auf menschliches Gonado-

tropin therapieresistenten Fällen bei 15 E HMG 20 A/24 Std. Mittels der immunologischen Methode untersuchten WIDE und GEMZELL (128) die HMG-Ausscheidung bei 6 Frauen nach der Menopause und fanden dabei Werte zwischen 100 und 400 IE/l. Bemerkenswert ist, daß normale Zykluswerte im Bereich von 20 IE bis 400 IE (100 bis 400 IE zur Zeit der Ovulation) gefunden wurden, d.h. daß die Ausscheidung in der Menopause gegenüber der Ausscheidung während des Zyklus nicht deutlich erhöht war.

Die mittlere Gonadotropinausscheidung in der Menopause scheint in der vorliegenden Arbeit mit 45 E HMG 20 A/Tag etwas niedrig. Es ist aber zu berücksichtigen, daß nur 14 Fälle untersucht wurden und daß während der Postmenopause ganz beträchtliche Tagesschwankungen bestehen (GÖRDES, 54). ALBERT (5) gibt sie mit 100 % an.

Dementsprechend niedrig lagen auch die immunologisch bestimmten Werte mit einem Mittelwert von 46,5 IE/24 Std. (27,0 bis 80,0 IE) aus 11 Einzelbestimmungen. Der entsprechende biologische Wert für diese Fälle betrug 41,5 E HMG 20 A/24 Std.

Eine Abhängigkeit der ausgeschiedenen Gonadotropinmenge vom zeitlichen Abstand zur Menopause, wie sie GÖRDES (54) gefunden hatte, ließ sich mit den wenigen Werten ebenfalls nachweisen. Dem eigenen Befund eines Nachlassens der Gonadotropinproduktion mit zunehmendem Menopausenalter stehen jedoch die steigenden Werte von BROWN (27) und ALBERT (7) gegenüber.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Probleme des Gonadotropinnachweises aus dem Harn mit biologischen, chemischen und immunologischen Methoden wurden dargelegt. Es folgte eine Beschreibung der biologischen Gonadotropinbestimmung mittels des Mäuse-Uterus-Testes (nach LEVIN und TYNDAL) sowie des von WIDE und GEMZELL in Verbindung mit der Firma Organon entwickelten immunologischen Schwangerschaftstestes "Pregnosticon", mit dem auch hypophysäres LH erfaßt wird.

Im speziellen Teil wurde zunächst über Erfahrungen mit der biologischen Methode berichtet. Sie betreffen den Vergleich des Hausstandards mit dem internationalen Standardpräparat HMG 20 A, die Sterblichkeit der Versuchstiere und die Toxizität der Urinextrakte.

Die immunhämatologische Bestimmung von ICSH aus Nichtschwangerenharn erforderte eine Anreicherung dieses Hormons. Die von WIDE angewandte Acetonfällung sowie eine einfache und eine modifizierte Alkoholfällung mit Reinigungsschritt wurden genau beschrieben und miteinander verglichen. Der Reinigungsschritt der letzteren Methode besteht in der Fällung inaktiver Substanzen bei pH 11 mit einem Volumen Äthylalkohol, während das aktive Substrat durch Zugabe von weiteren vier Volumen Alkohol bei pH 5 gewonnen wird.

Die mit der Aceton-, der Alkohol- und der erweiterten Alkoholmethode gefällten Extraktmengen betrugen 7040 mg, 5624 mg und 2601 mg pro Liter, während die Recoveries in derselben Reihenfolge eine Ausbeute von 50 %, 80 bis 100 % und

100 % erbrachten.

Die biologische Gonadotropinbestimmung wurde in 47 Untersuchungen bei 38 Frauen mit Amenorrhoe sowie in 15 Untersuchungen bei 14 Frauen nach der Menopause durchgeführt. Die immunologische Methode kam parallel zur biologischen an 22 amenorrhoeischen sowie an 10 Frauen nach der Menopause zur Anwendung.

Für die Frauen mit Amenorrhoe ergab sich ein einigermaßen konstantes Verhältnis von immunologischer zu biologischer Aktivität ($= 1,32 \pm 0,42$), während sich ein solches für die Frauen nach der Menopause nicht sicher nachweisen ließ ($= 1,12 \pm 0,72$).

Nach der Höhe der Gonadotropinausscheidung konnten die Frauen mit Amenorrhoe in 3 Gruppen eingeteilt werden, deren Grenzen bei 15,0 und 35,0 E HMG 20 A bzw. 20,0 und 40,0 IE/24 Std. lagen. Dabei kamen 25 Frauen in die Gruppe mit niedriger, 8 Frauen in die mittlere und 5 Frauen in die Gruppe mit eindeutig erhöhter Gonadotropinausscheidung. Der Wert der immunologischen LH-Bestimmung zur Erkennung hypergonadotroper Amenorrhoeen kann daraus ersehen werden, daß die biologisch und immunologisch gefundenen Werte immer dieselben Gruppen betrafen.

Die absolute Höhe der Gonadotropinausscheidung bei amenorrhoeischen Frauen schwankte von 1,05 bis 120,0 E HMG 20 A bzw. 3,22 bis 104,0 IE pro Tag.

Für die Frauen nach der Menopause wurde eine mittlere Ausscheidungshöhe von 45,0 E/Tag errechnet. Als durchschnitt-

liche Tagesausscheidung für die Zeit von 1 bis 5 Jahren nach der Menopause ergaben sich 56,7 E (7 Bestimmungen), von 6 bis 19 Jahren 43,6 E (6 Bestimmungen) und von mehr als 20 Jahren 9,6 E HMG 20 A (2 Bestimmungen).

Untersucher	Urinkollektiv	Extraktmenge mg/l	vor mg/24h	/ nach mg/l	Reinigung mg/24h
BUCHHOLZ (29)	427 l v. gesunden, ge- schlechtsreifen Frauen			186	
LORAINÉ (81)	6,6 l v. Frauen in der Menopause			227	
GÖRDES (51)	10,6 l v. Frauen in der Corpus-luteum-Phase	426			
	80,2 l v. Frauen in der Menopause	340			
Eigene Unter- suchungen	24 l v. Frauen in der Menopause	340	286	132	112
	78 l v. Frauen mit Amenorrhoe	507	368	163	118

Tabelle I

Vergleich der mit der Kaolin-Acetonmethode nach LORAINÉ und BROWN (81) gewonnenen Extrakt-
mengen von 4 Untersuchern.

Nr.	Chargen-Nr.	Lösungsmittel	1 : 50	Verdünnung 1 : 100		1 : 200	Anmerkungen
1	456069	Phosphatpuffer	+++	-	-	-	
2	457738	"	+++	+ → -	-	-	Gleicher Substandard wie 1), 2 Tage tiefgefroren
3	488890	"	+++	-	-	-	
4a	451156	"	+++	-	-	-	Gleicher Substandard wie 3), 9 Tage tiefgefroren
4b	451156	"	+++	+ → -	-	-	Neuer Substandard
5a	458893	Männerharn	+++	+ → -	-	-	
5b	458893	Phosphatpuffer	+++	+ → -	-	-	Gleiches Ergebnis wie 5a !
6	460932	"	+++	+ → -	-	-	
7	461409	"	+++	+ → -	-	-	
8	462397	"	+++	+ → -	-	-	

Tabelle II

Vergleich der verschiedenen Pregnosticon-Chargen anhand des HMG-Substandards Organon-Res. Prep.
Nr. 3434.

Nr.	Pregn.Nr.	Lösungsmittel	HCG-Standard-Konzentration mit entsprechender Test- reaktion (Ringgröße).	Konz.-Angabe in IE HCG/ml	Verdünn.Stufe		
1a	458893	Phosphatpuffer	5,00:+	10,0:++	20,0:+++	40,0:+++	1 : 2
1b	458893	Männerharn	0,62:+	1,25:++	2,50:+++	5,00:+++	1 : 2
2a	465757	Phosphatpuffer	3,98:-	5,01:+	6,30:++	7,95:+++	1 : 1,26
2b	465757	Männerharn	0,63:-	0,79:+	1,00:++	1,26:+++	1 : 1,26
3	460932	Männerharn	0,63:-	0,79:+	1,00:++	1,26:+++	1 : 1,26
4	461409	Männerharn	0,63:-	0,79:+	1,00:++	1,26:+++	1 : 1,26

Tabelle III

Standardisierung der Pregnosticon-Empfindlichkeit mit dem Internationalen HCG-Standard-Präparat und Zuordnung der Ringgrößen (+, ++, +++ und -).

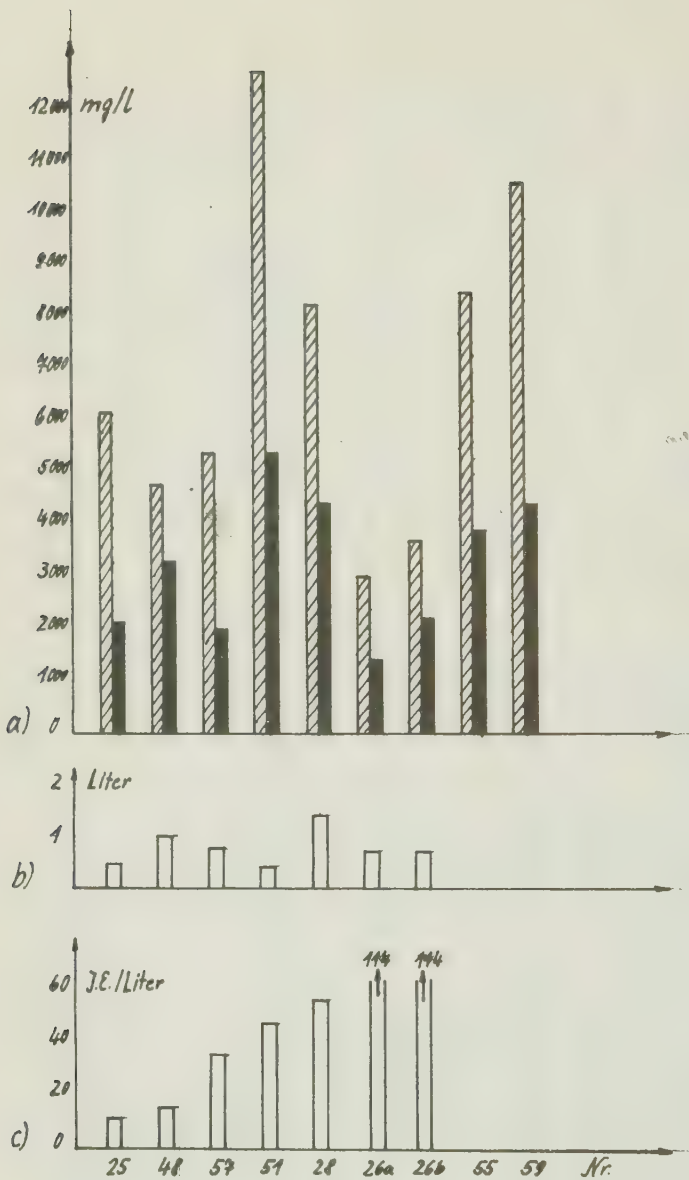


Abbildung II (zu Tabelle IV)

- a) Mittels der Acetonfällung gewonnene Fällungsmengen (Schraffiert) und ihre Rückstände nach Lösen in Phosphatpuffer (schwarz).
 b) Die zugehörigen Tagesurine.
 c) Die immunologische Aktivität der zugehörigen Urine in IE/l.

Nr.	Fällungsmenge mg / l	Rückstand mg / l	Fällungsmenge mg / 24 Std.	Aktivität IE/l	Urinmenge l / 24 Std.
25	6200	2120	2015	12	0,48
48	4800	3300	4800	16	1,00
57	5400	2000	4050	36	0,75
51	12800	5400	5360	48	0,42
28	8260	4430	12960	57	1,40
26a	3090	1430	2106	11	0,70
26b	3700	2110	3290	11	0,70
55	8500	3900	--	--	--
59	10600	4400	--	--	--
MW	7040	3800	4949		0,78

Tabelle IV

Mittels der Aceton-Methode gewonnene Fällungsmengen und ihre Rückstände nach Lösen in Phosphatpuffer. Die mittlere Konzentration war 20 : 1.
Der Urin Nr. 26a wurde vor der Fällung auf pH 5,0 eingestellt, 26b unverändert verarbeitet.

Methode	Pregn.Nr.	Testsubst.	dir. Test	Lös. Mittel	Konzentr.	Verdünnungs- stufe	indir. Test	Wiedergefun- dene Menge %
Acetonfällung	458893	HMG 3434 0,1 Amp.	1: 50 +++ 1:100 +	Phosphatp. 50 ml	10 : 1	-1) = 1: 25 0) = 1: 50	+++ + → -	50 %
	460932	" "	1: 50 +++ 1:100 + → -	Männerharn 50 ml	20 : 1	-1) = 1: 25 0) = 1: 50 1) = 1:100	+++ + → - -	50 %
	461409	" 0,2 Amp.	1: 50 +++ 1:100 + → -	" "	20 : 1	-1) = 1: 25 0) = 1: 50 1) = 1:100	+++ + → - -	50 %
Alkoholfällung mit Ansäuerung des Urins	458893	HMG 3434 0,2 Amp.	1: 50 +++ 1:100 + → -	Phosphatp. 50 ml	10 : 1	0) = 1: 25 1) = 1: 50 2) = 1:100	+++ + -	66 %
	460932	" 0,1 Amp.	1: 50 +++ 1:100 + → -	Männerharn 50 ml	20 : 1	0) = 1: 25 1) = 1: 50 2) = 1:100	+++ ++ -	84 %
	461409	" 0,2 Amp.	1: 50 +++ 1:100 + → -	" 50 ml	20 : 1	1) = 1: 25 2) = 1: 50 3) = 1:100	+++ ++ + → -	91 - 100 %
Alkoholfällung mit Reinigung	460932	HMG 3434 0,1 Amp.	1: 50 +++ 1:100 + → -	Männerharn 50 ml	20 : 1	0) = 1: 25 1) = 1: 50 2) = 1:100	+++ +++ + → -	ca. 100 %
	461409	" 0,2 Amp.	1: 50 +++ 1:100 + → -	" 50 ml	20 : 1	1) = 1: 25 2) = 1: 50 3) = 100	+++ +++ + → -	ca. 100 %
	462397	" 0,4 Amp.	1: 50 +++ 1:100 + → -	" 50 ml	20 : 1	2) = 1: 25 3) = 1: 50 4) = 1:100	+++ +++ + → -	ca. 100 %
	462397	" 0,5 Amp.	1: 50 +++ 1: 63 ++ 1: 79 + 1:100 + → -	" 50 ml	20 : 1	1: 50 1: 63 1: 79 1:100	+++ ++ + + → -	100 %

Tabelle V: Ergebnisse der Recoveries bei verschiedenen Fällungsmethoden.

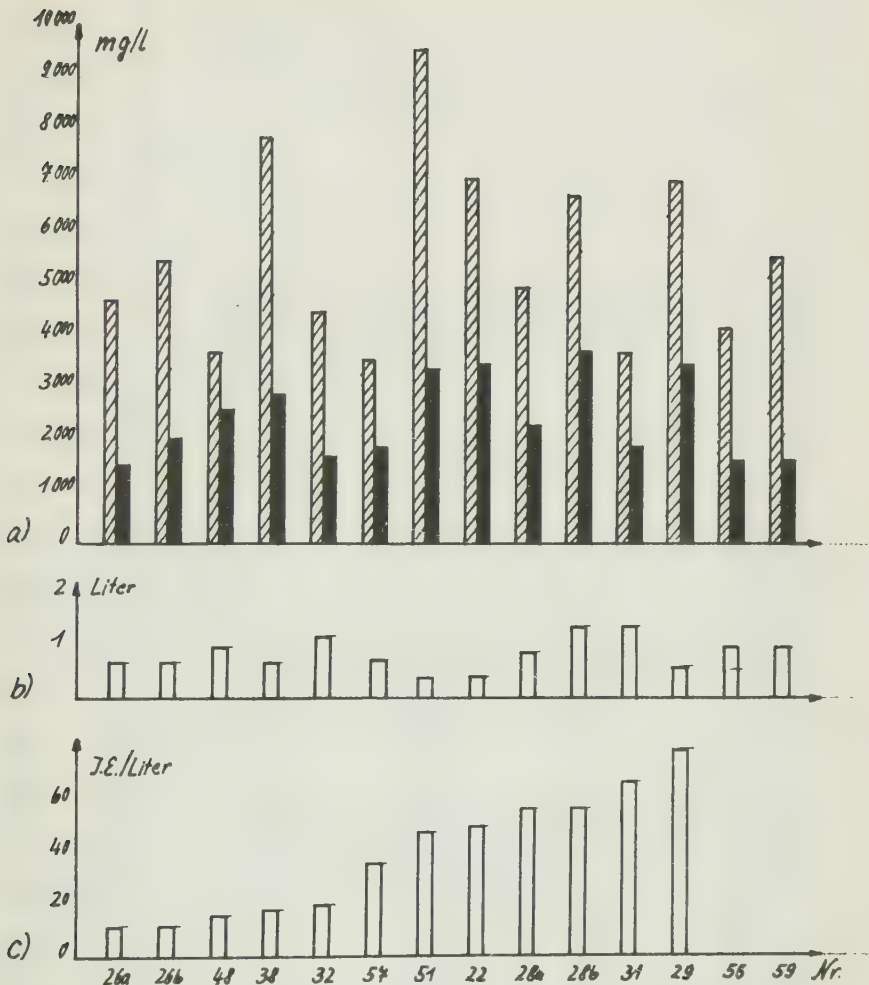


Abbildung III (zu Tabelle VI)

- a) Mittels der einfachen Alkoholfällung gewonnene Fällungsmengen (schraffiert) und ihre Rückstände nach Lösen in Phosphatpuffer (schwarz).
 b) Die zugehörigen Tagesurinemengen.
 c) Die immunologische Aktivität der zugehörigen Urine in IE/l.

Nr.	Fällungsmenge mg / l	Rückstand mg / l	Fällungsmenge mg / 24 Std.	Aktivität IE / l	Urinmenge l / 24 Std.	pH-Konzentration
26a	4700	1500	3290	12	0,70	5,0
26b	5450	2030	3815	12	0,70	ø
48	3700	3600	3700	16	1,00	5,0
38	7860	2900	5500	18	0,70	5,0
32	4500	1660	5400	20	1,20	5,0
57	3500	1800	2620	36	0,75	5,0
51	9600	3400	4040	48	0,42	5,0
22	7100	3480	6400	50	0,90	5,0
28a	4950	2290	6940	57	1,40	5,0
28b	6800	3750	9520	57	1,40	ø
31	3760	1900	2050	67	0,61	5,0
29	7010	3480	4040	80	0,57	5,0
55	4200	1600	--	--	--	5,0
59	5600	1600	--	--	--	5,0
MW	5620	2420	4940		0,86	

Tabelle VI

Mittels der einfachen Alkohol-Methode gewonnene Fällungsmengen und ihre Rückstände nach Lösen in Phosphatpuffer. Die mittlere Konzentration betrug 35 : 1.

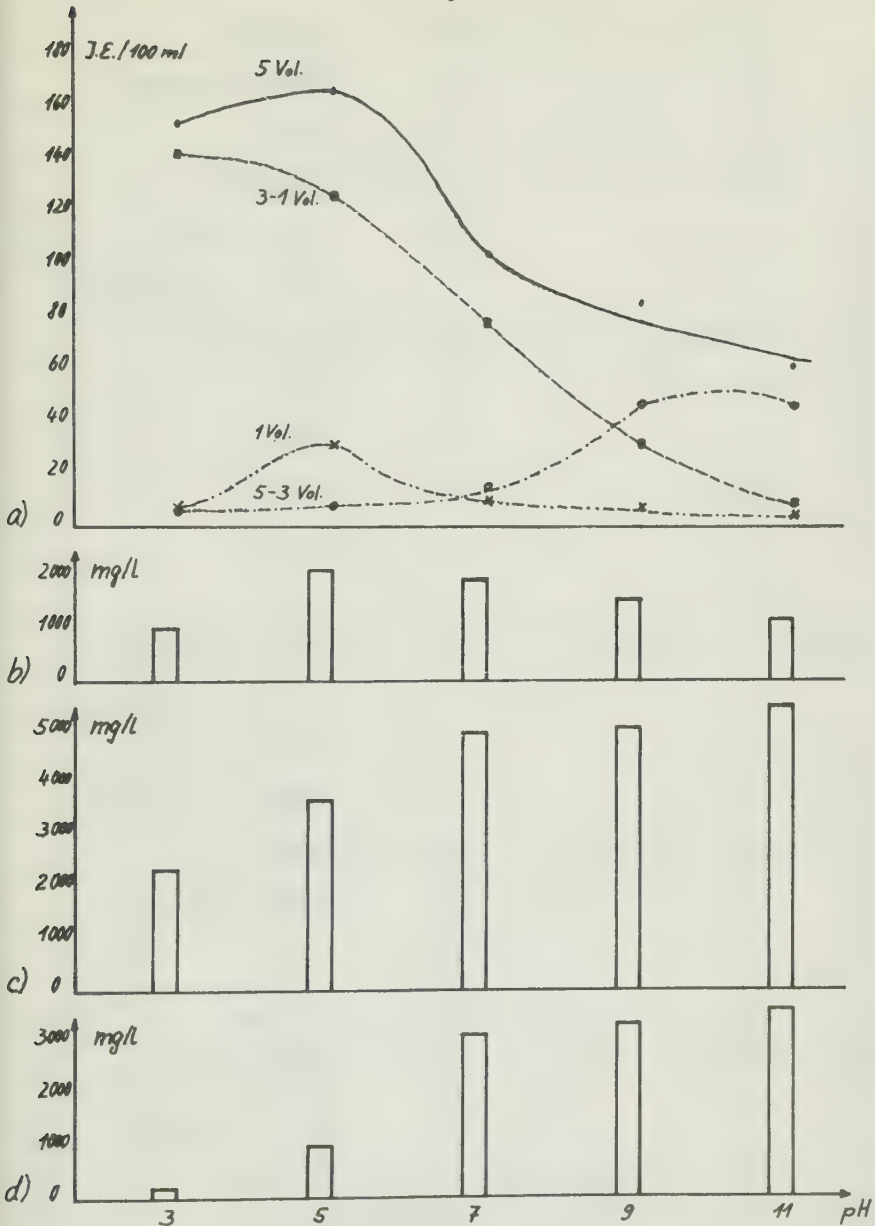


Abbildung IV (zu Tabelle VII)

- a) Aktivitätsausbeuten bei verschiedenen pH-Werten durch Zugabe verschiedener Alkoholmengen.
 b), c) und d) Fällungsmengen bei verschiedenen pH-Werten nach Zugabe von 1 Vol. Alkohol (d), 3 Vol. Alkohol (c) und 5 Vol. Alkohol (b).

Vol. Alkohol	pH-Wert	Fällungsmenge mg / l	Aktivität in % der Gesamtaktivität (= 170 IE/100 ml)
1 Vol.	3,0	300	8
1 Vol.	5,0	1110	32
1 Vol.	7,0	3200	10
1 Vol.	9,0	3360	8
1 Vol.	11,0	3620	5
3 Vol., -1 Vol.	3,0	2440	144
3 Vol., -1 Vol.	5,0	3740	128
3 Vol., -1 Vol.	7,0	5000	80
3 Vol., -1 Vol.	9,0	5100	32
3 Vol., -1 Vol.	11,0	5520	10
5 Vol., -3 Vol.	3,0	1050	8
5 Vol., -3 Vol.	5,0	2120	8
5 Vol., -3 Vol.	7,0	1920	16
5 Vol., -3 Vol.	9,0	1540	48
5 Vol., -3 Vol.	11,0	1120	48
5 Vol.	3,0	3790	156
5 Vol.	5,0	6970	168
5 Vol.	7,0	10120	106
5 Vol.	9,0	10000	88
5 Vol.	11,0	10260	63
			84,4
			75,3
			47,0
			18,8
			5,9
			4,7
			4,7
			9,4
			28,2
			28,2
			91,7
			98,9
			62,5
			51,8
			37,1

Tabelle VII

Die Tabelle zeigt die Abhängigkeit von Fällungsmenge und Aktivitätsausbeute von Alkoholvolumen und pH-Wert.

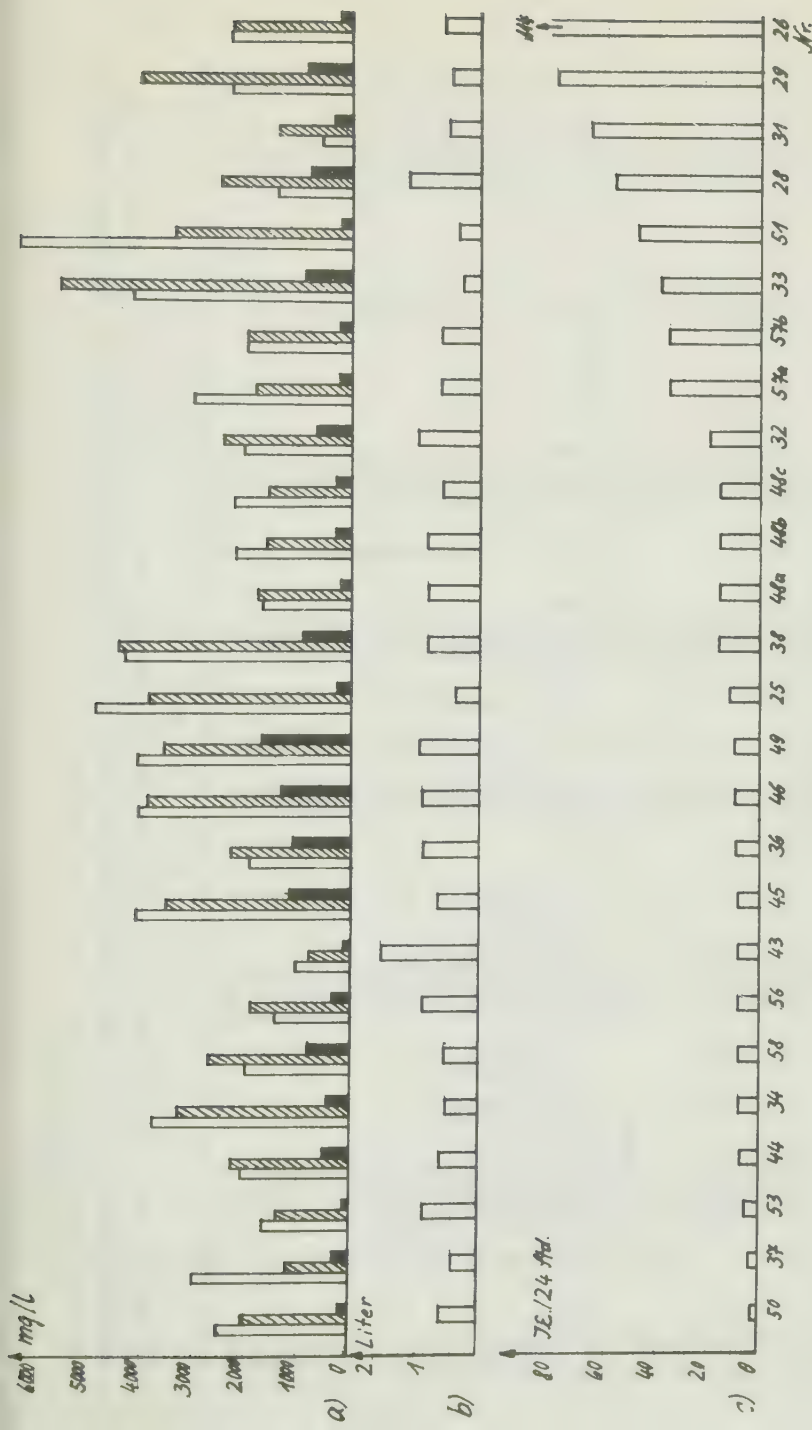


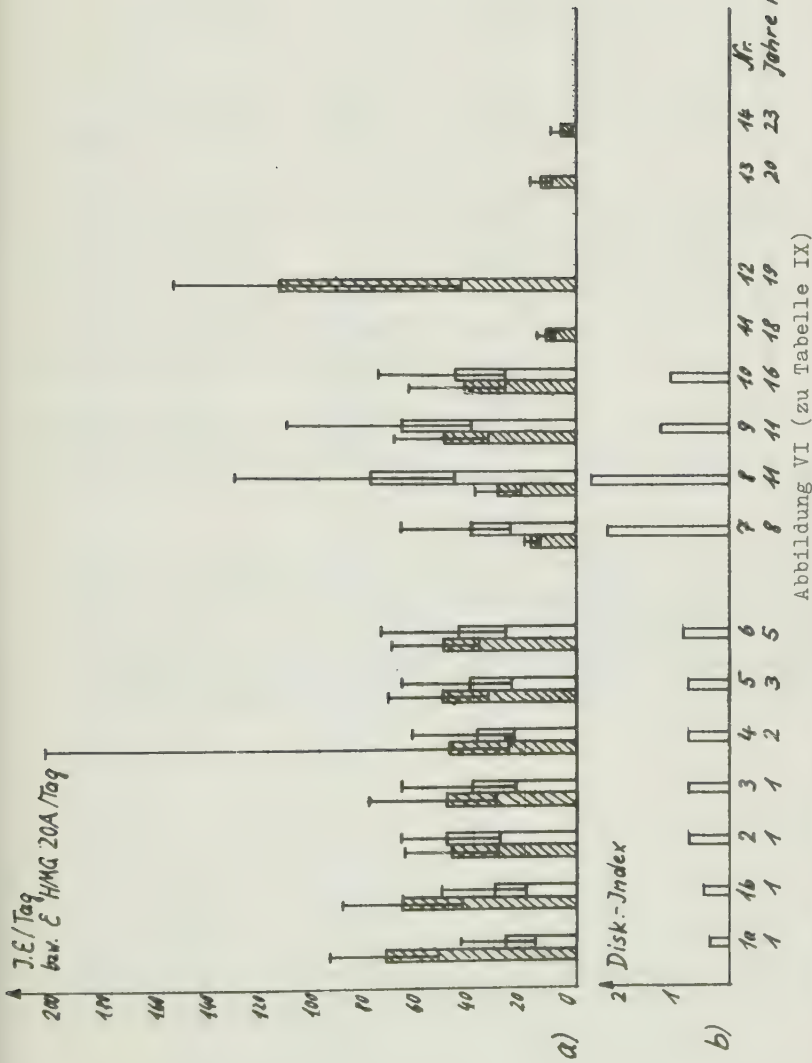
Abbildung V (zu Tabelle VIII)

- a) Mittels der Alkoholfällung mit Reinigungsschritt gewonnene Fällungsmengen. Weiß: inaktive Fällungen; schraffiert: aktive Fällungen; schwarz: Rückstände nach Lösen der aktiven Fällungen in Phosphatpuffer.
 b) Die zugehörigen Tagesurinmengen.
 c) Die immunologische Aktivität der zugehörigen Urine in IE/l.

Nr.	Fällungsm. bei pH 11 u. 1Vol mg/l	Fällungsm. bei pH 5 u. 5Vol. mg/l	Rückstand mg/l	Ges. Fäll. mg/l	Ges. Fäll. mg/24Std.	Aktivität IE/l	Urinmenge l/24 Std.
50	2500	2000	150	4500	3370	3	0,75
37	3000	1200	250	4200	2100	4	0,50
53	1650	1400	120	3050	3300	5	1,08
44	2060	2270	500	4330	3300	7	0,76
34	3760	3300	400	7060	4250	8	0,62
58	2000	2700	800	4700	3140	8	0,67
56	1400	1850	300	3250	3580	8	1,10
43	1050	740	80	1790	3200	8	1,90
45	4130	3530	1130	7660	5980	8	0,78
36	1910	2280	1100	4190	4600	9	1,10
46	4080	3910	1330	8000	8960	9	1,12
49	4100	3600	1700	7700	8760	9	1,14
25	4890	3890	240	8780	4210	12	0,48
48a	1700	1750	200	3450	3450	16	1,00
48b	2200	1600	250	3800	3800	16	1,00
48c	2250	1550	250	3800	3800	16	1,00
38	4220	4280	850	8500	5950	18	0,70
32	2080	2470	650	4550	5470	20	1,20
57a	3000	1800	200	4800	3590	36	0,75
57b	2000	2000	200	4000	3000	36	0,75
33	4200	5600	850	9800	3350	39	0,34
51	6400	3400	200	9800	4120	48	0,42
28	1430	2500	760	3930	5520	57	1,40
31	580	1380	310	1960	1190	67	0,61
29	2250	4020	800	6270	3820	80	0,57
26	2260	2220	120	4480	3140	114	0,70
55	1800	2500	100	4300	--	--	--
59	2500	3100	80	5600	--	--	--
MW	2657	2601	497	5258	4540	--	0,86

Tabelle VIII

Die Tabelle zeigt die aktiven und inaktiven Fällungsmengen sowie die Gesamtfällungsmengen und Lösungsrückstände, die mit der fraktionierten Alkoholfällung gewonnen wurden. Die Anordnung erfolgte nach dem LH-Gehalt der Urine. Die mittlere Konzentration betrug 90 : 1.



a) Gonadotropinausscheidung in der Menopause: Gesamtgonadotropin biolog. best. (schraffiert) und LH immunolog. best. (weiß) mit Angabe der Vertrauensgrenzen

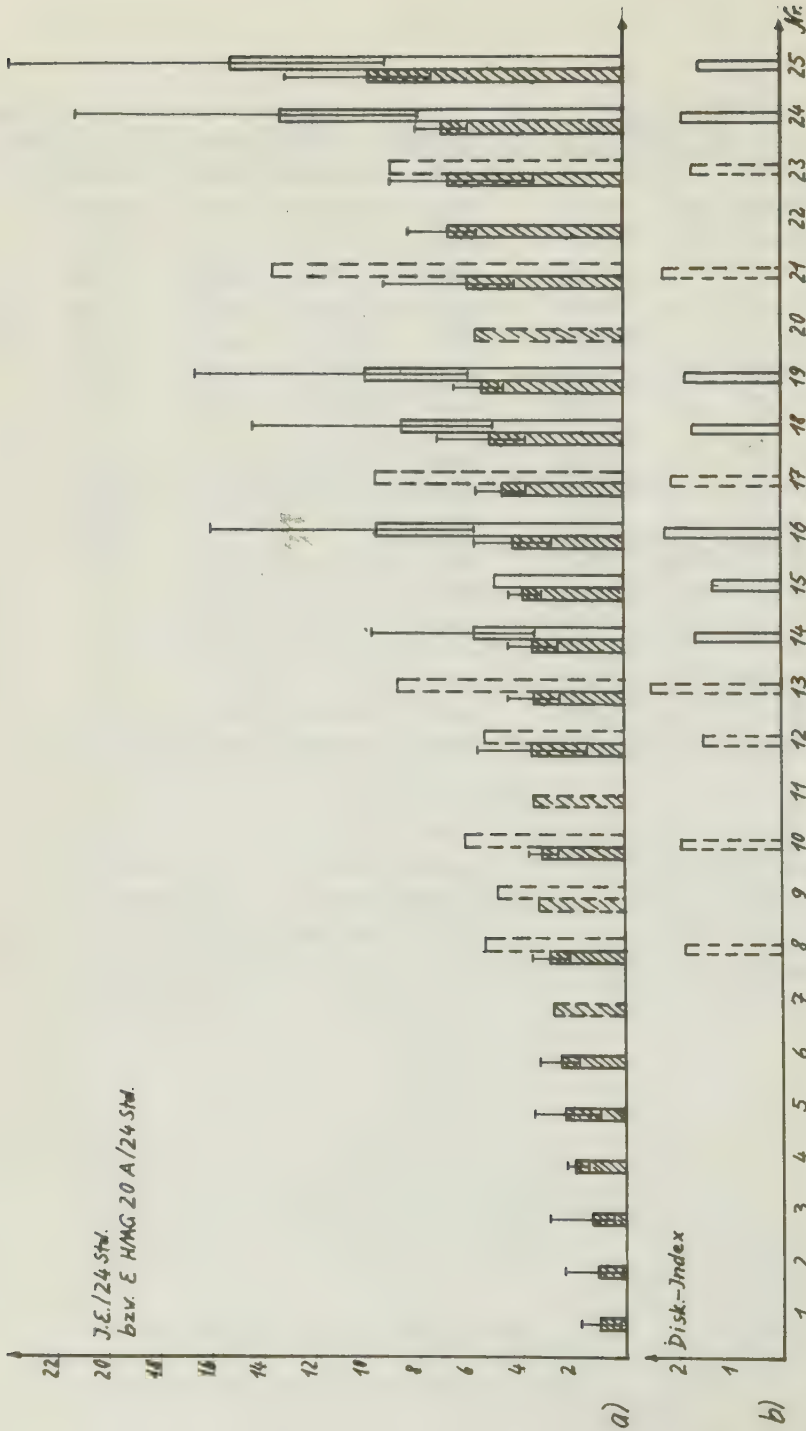
b) Diskriminierungsindices (IE/E HMG 20 A).

Nr.	Name	Alter	Menop. seit	Krankheit	Biolog. Best. HMG 20A/24Std	g	t1	t2
1a	R.G.	52	1 J.	gesund	73,7	0,135	0,94	1,06
1b	R.G.	52	1 J.	gesund	67,7	0,184	1,44	1,50
2	M.L.	43	1 J.	Hysterekt.	48,0	0,210	1,21	1,44
3	A.R.	50	1 J.	Narbenbr.	51,2	0,240	0,91	1,39
4	G.J.	50	2 J.	Desc. ut.	48,5	0,445	0,32	3,52
5	R.R.	55	3 J.	Cystocele	52,0	0,260	0,91	1,90
6	A.K.	55	5 J.	Adeno-Ca.	52,0	0,138	1,82	1,97
7	F.F.	59	8 J.	Desc. ut.	17,1	0,132	2,88	2,73
8	H.G.	66	11 J.	Colpitis	30,1	0,135	0,92	2,87
9	R.S.	61	11 J.	Ovarialfib.	51,0	0,170	0,65	1,10
10	T.W.	66	16 J.	Desc. ut.	42,8	0,250	0,41	0,20
11	T.S.	72	18 J.	Ov.-Cystom	10,9	0,030	3,64	1,04
12	A.M.	69	19 J.	Coll.-Ca.	105,0	0,330	1,61	2,62
13	B.S.	69	20 J.	Desc. ut.	13,6	0,080	3,90	4,70
14	O.S.	67	23 J.	Coll.-Ca.	5,6	0,334	1,32	3,36

Tabelle IX

Die Tabelle zeigt die Hormonausscheidung der Menopause, und zwar in biologischen und immunologischen Einheiten. Außerdem sind die Vertrauensgrenzen, Gültigkeitskriterien und Präzisionsmaße sowie die Diskriminierungsindices IE/E HMG 20 A angegeben. Die einzelnen Fälle sind nach dem Abstand von der Menopause angeordnet.

λ	L	Vertr.Grenzen HMG 20A/24Std	Immun.Akt. IE/24 Std.	Vertr.Grenzen	Diskr.Index IE/BE
0,085	11,8	54,6 - 96,0	27,0	16,2 - 44,8	0,38
0,119	8,4	45,5 - 91,5	32,0	19,2 - 53,4	0,50
0,115	8,7	31,6 - 67,0	50,0	30,0 - 68,5	0,79
0,112	8,9	35,5 - 82,5	40,8	24,5 - 68,0	0,80
0,175	5,7	27,0 - 206,0	38,4	25,1 - 64,1	0,79
0,120	8,3	34,8 - 72,9	41,0	24,6 - 68,5	0,79
0,085	11,7	40,2 - 72,0	45,6	27,3 - 76,0	0,88
0,100	10,0	15,5 - 20,2	41,6	26,5 - 68,5	2,34
0,084	11,9	21,1 - 38,9	80,0	48,0 - 133,0	2,66
0,110	9,1	34,7 - 71,4	68,0	41,0 - 113,0	1,33
0,138	7,3	28,4 - 65,0	46,5	28,0 - 77,5	1,09
0,060	17,5	9,8 - 12,3	--	-- --	--
0,160	6,3	44,6 - 157,5	--	-- --	--
0,078	12,8	10,3 - 16,8	--	-- --	--
0,160	6,2	1,9 - 8,40	--	-- --	--



a) Gonadotropinausscheidung von Frauen mit Amenorrhoe: Gesamtgonadotropin biolog. best. (Schraffiert) und LH immunolog. best. (weiß) mit den zugehörigen Vertrauensgrenzen.
b) Diskriminierungsindices (IE/E HMG 20 A). Gestrichelte Säulen bedeuten "kleiner als" angegebener Wert.

Name	Alter	Menarche mit X J.	Periode vord.A.	Ameno. seit	Biol.Akt. E HMG/24h	g	t1	t2
E.H.	20	13	unreg.	5 J.	1,05	0,34	2,30	4,88
W.P.	28	14	35-40/4	2 J.	1,05	0,60	2,10	3,50
C.S.	24	15	28-42/-	4 J.	1,28	0,24	2,44	4,38
E.P.	22	12	14-60/-	5 Mon.	1,95	0,08	4,03	3,33
H.C.	24	17	reg.	4 Mon.	2,38	0,23	2,52	5,04
A.T.	25	17	unreg.	6 J.	2,47	0,13	0,98	0,45
R.S.	25	13	unreg.	1 J.	2,74	--	--	--
G.J.	26	--	--	primär	2,90	0,12	5,10	5,85
J.S.	23	18	unreg.	2 J.	3,30	--	--	--
B.K.	32	14	28-42/-	10 J.	3,20	0,03	8,00	8,70
R.R.	31	14	reg.	7 J.	3,50	--	--	--
M.D.	22	12	reg.	6 Mon.	3,60	0,33	2,90	1,86
J.M.	23	14	unreg.	7 J.	3,50	0,12	4,40	3,90
G.M.	20	17	unreg.	3 J.	3,54	0,09	1,97	4,10
H.K.	18	12	reg.	6 Mon.	3,90	0,03	7,90	5,28
I.H.	26	15	unreg.	6 J.	4,30	0,19	2,98	1,42
A.S.	30	23	Hypomen.	4 Mon.	4,67	0,08	3,45	1,30
B.P.	20	14	unreg.	6 Mon.	5,20	0,17	1,46	0,00
M.K.	24	13	reg.	6 Mon.	5,50	0,57	3,87	0,68
R.E.	21	12	reg.	3 Mon.	5,70	--	--	--
I.S.	25	11	reg.	6 Mon.	6,04	0,23	1,90	0,95
T.G.	34	18	Monoph.	1 J.	6,80	0,08	2,78	3,47
A.L.	30	--	--	primär	6,80	0,27	1,71	2,64
S.E.	18	14	unreg.	4 Mon.	7,06	0,03	8,30	7,45
I.H.	26	15	unreg.	6 J.	9,90	0,14	1,35	0,42

Tabelle Xa

der Tabelle sind die Gonadotropinausscheidungen von Frauen mit norrhoe in biologischen und immunologischen Einheiten angegeben. Soweit es möglich war, wurden auch die Vertrauensgrenzen, tigkeitkriterien und Präzisionsmaße sowie der Diskriminierungsindex berechnet. Die einzelnen Fälle sind nach steigender biologischer Aktivität angeordnet.

λ	L	Vertr.Grenzen HMG 20A/24Std	Immun.Akt. IE/24 Std.	Vertr.Grenzen	Diskr.Index IE/BE
0,16	6,2	0,24 - 1,71	--	--	--
0,17	5,6	0,05 - 2,04	--	--	--
0,14	7,6	0,58 - 1,90	--	--	--
0,08	13,8	1,56 - 2,21	--	--	--
0,13	7,4	1,01 - 3,50	--	--	--
0,10	10,0	1,85 - 3,22	--	--	--
--	--	--	--	--	--
0,06	16,5	2,02 - 3,58	5,40	--	1,86
--	--	--	4,90	--	--
0,04	24,0	2,69 - 3,69	6,20	--	1,94
--	--	--	--	--	--
0,14	7,1	1,53 - 5,70	5,40	--	1,48
0,06	15,9	2,44 - 4,50	8,80	--	2,50
0,07	14,1	2,61 - 4,40	5,80	3,50 - 9,70	1,64
0,05	21,0	3,39 - 4,41	5,00	--	1,28
0,12	8,2	2,84 - 5,80	9,60	5,80 -16,00	2,22
0,05	20,0	3,80 - 5,70	9,60	--	2,06
0,10	10,0	3,80 - 7,20	8,60	5,10 -14,30	1,65
0,06	15,2	4,65 - 6,50	10,00	6,00 -16,60	1,82
--	--	--	--	--	--
0,13	7,5	4,25 - 9,30	13,60	--	2,25
0,07	14,6	5,75 - 8,32	--	--	--
0,14	7,0	3,45 - 9,00	9,00	--	1,65
0,05	22,1	6,12 - 8,00	13,30	--	1,88
0,09	11,5	7,40 -13,10	15,20	9,10 -25,30	1,54

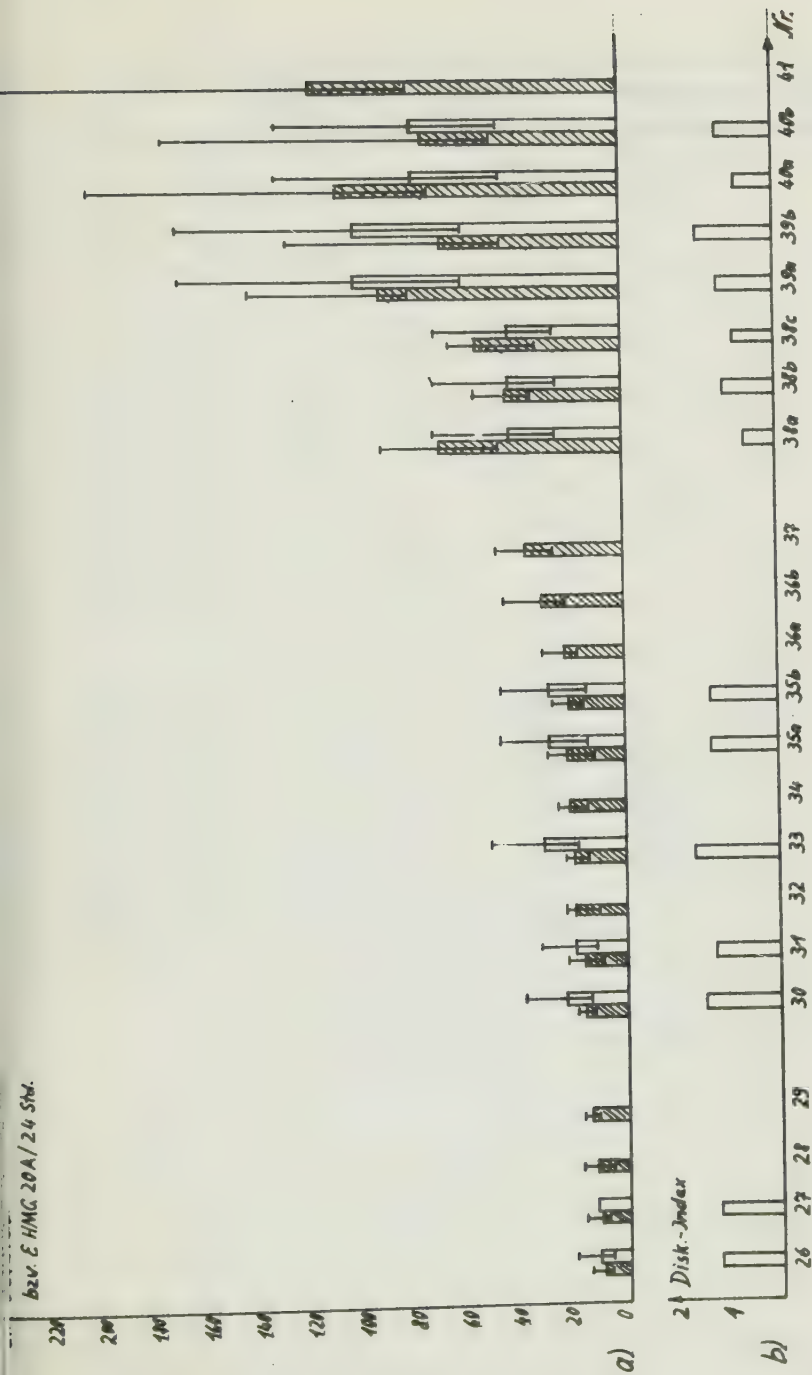


Abbildung VIIb (zu Tabelle Xb)

Erklärungen siehe Abbildung VIIa.

Maßstab auf 1/10 desjenigen der Abbildung VIIa reduziert.

Nr.	Name	Alter	Menarche mit X J.	Periode vor d.A.	Ameno. seit	Biol.Akt. E HMG/24h	g	t1	t2
26	W.P.		vergl.	Nr. 2		10,7	0,17	0,25	0,22
27	A.S.		vergl.	Nr.17		11,4	0,18	0,64	0,69
28	M.S.	35	13	3xjhr.	6 Mon.	13,2	0,24	1,35	2,96
29	A.L.		vergl.	Nr.23		14,7	0,05	2,84	5,00
30	C.F.	28	15	unreg.	5 Mon.	16,1	0,03	6,05	4,52
31	I.R.	19	15	21-84/-	8 Mon.	16,1	0,24	0,21	1,63
32	I.W.	25	16	unreg.	4 Mon.	17,0	0,21	0,66	1,38
33	G.C.	17	--	--	primär	19,7	0,05	2,58	0,77
34	M.A.	23	13	35-42/5	5 Mon.	20,8	0,09	1,16	0,23
35a	I.W.		vergl.	Nr.32		22,1	0,18	3,70	4,80
35b	I.W.		vergl.	Nr.32		21,9	0,12	2,08	0,48
36a	H.S.	29	--	--	primär	23,5	0,24	0,24	0,77
36b	H.S.	29	--	--	primär	31,9	0,34	2,22	2,84
37	E.C.	36	13	unreg.	5 Mon.	38,0	0,14	0,16	0,77
38a	H.K.	29	17	unreg.	6 J.	70,5	0,17	1,02	1,27
38b	H.K.	29	17	unreg.	6 J.	45,0	0,14	2,04	0,68
38c	H.K.	29	17	unreg.	6 J.	56,5	0,37	0,57	0,54
39a	M.A.		vergl.	Nr.34		94,0	0,12	0,66	2,16
39b	M.A.		vergl.	Nr.34		70,3	0,22	0,72	2,00
40a	M.R.	26	15	reg.	4 J.	110,5	0,28	2,15	1,68
40b	M.R.	26	15	reg.	4 J.	76,5	0,27	1,19	3,84
41	E.P.	20	18	unreg.	4 Mon.	120,0	0,29	2,64	2,09

Tabelle Xb

Anmerkung siehe Tabelle Xa.

λ	L	Vertr.Grenzen HMG 20A/24Std	Immun.Akt. IE/24 Std.	Vertr.Grenzen	Diskr.Index IE/E HMG20A
0,11	8,8	7,9 - 14,8	12,4	7,5 - 20,6	1,16
0,12	8,4	8,4 - 16,2	13,6	--	1,19
0,12	8,0	5,9 - 17,9	--	--	--
0,06	16,9	12,2 - 17,2	--	--	--
0,05	20,4	13,9 - 18,2	24,0	14,4 - 40,0	1,49
0,14	7,3	9,6 - 22,8	20,0	12,0 - 33,3	1,24
0,12	7,9	11,0 - 23,4	--	--	--
0,06	16,7	16,8 - 23,1	32,0	19,2 - 53,4	1,68
0,09	11,0	16,0 - 25,6	--	--	--
0,11	8,7	12,2 - 30,4	29,1	17,5 - 48,5	1,32
0,08	12,4	17,0 - 28,6	29,1	17,5 - 48,5	1,32
0,11	8,9	18,6 - 32,1	--	--	--
0,13	7,5	23,2 - 47,2	--	--	--
0,10	9,7	28,2 - 49,4	--	--	--
0,11	8,8	49,2 - 94,5	44,0	26,4 - 73,4	0,62
0,05	18,5	36,0 - 58,6	44,0	26,4 - 73,4	0,98
0,13	7,5	33,4 - 67,6	44,0	26,4 - 73,4	0,79
0,10	10,0	83,0 - 145,0	104,0	62,5 - 172,0	1,11
0,16	6,1	48,5 - 130,0	104,0	62,5 - 172,0	1,48
0,15	6,8	76,0 - 208,0	80,6	48,4 - 134,2	0,73
0,12	8,4	51,5 - 177,0	80,6	48,4 - 134,2	1,05
0,15	6,6	82,5 - 242,0	--	--	--

Name	Nr.	E HMG 20 A/ 24 Std.	IE/24 Std.	E HMG/IE
I.H.	16	4,3	9,6	2,22
	25	9,9	15,2	1,54
A.S.	17	4,7	9,6	2,07
	27	11,4	13,6	1,19
A.L.	23	6,8	9,0	1,65
	29	14,7	--	--
I.W.	32	17,0	--	--
	35a	22,1	29,1	1,32
	35b	21,9	29,1	1,32
M.A.	34	20,8	--	--
	39a	94,0	104,0	1,11
	39b	70,3	104,0	1,48

Tabelle XI

Ergebnisse wiederholter Gonadotropinbestimmungen bei 5 Frauen mit Amenorrhöe.

VII. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1 Albert, A.
Human Pituitary Gonadotrophin. Ch. C. Tomas, Publisher;
Springfield, Ill. USA (1961)
- 2 Albert, A., R. Borth, E. Diczfalusy, J.A. Loraine, B. Lundenfeld, J.W. McArthur and E. Rosenberg
Ergebnisse einer Zusammenarbeit zur Ermittlung einer einheitlichen Aufarbeitung der Harngonadotropine.
J. Clin. Endocrin. a. Metab. 18/10, 117 (1958)
- 3 Albert, A. and S. Kelly
Studien zur Biologie der menschlichen Gonadotropine:
II Vergleich zwischen HPG und HCG im Harn des Menschen. J. Clin. Endocrin. a. Metab. 18/10, 1067 (1958)
- 4 Albert, A., S. Kelly and J. Kobi
Studien zur Biologie der menschlichen Gonadotropine:
I Die hypophysären Gonadotropine des Menschen im Harn von normalen Männern, Kastratinnen und Frauen nach der Menopause. J. Clin. Endocrin. a. Metab. 18/8, 843 (1958)
- 5 Albert, A., S. Kelly, L. Silver, J. Kobi, L. Bloodsworth
Tagesschwankungen der Gonadotropinausscheidung.
J. Clin. Endocrin. a. Metab. 18/5, 453 (1958)
- 6 Albert, A., S. Kelly, L. Silver and J. Kobi
Extraktion und Reinigung der Harngonadotropine.
J. Clin. Endocrin. a. Metab. 18/6, 600 (1958)
- 7 Albert, A., R.V. Randall, R.A. Smith and C.E. Johnson
Urinary Excretion of Gonadotropin as a Function of Age.
In: Hormones and the Aging Process. Edited by E.T. Engle and G. Pincus; Academic Press Inc. New York (1956)
- 8 Albert, A. and E. Rosenberg
Untersuchungen über die menschlichen Hypophysengonadotropine beim Mann und bei der Frau. J. Clin. Endocrin. a. Metab. 19/5, 518 (1959)
- 9 Ammon, R. und W. Dirscherl
Fermente, Hormone und Vitamine. Bd. II: Hormone.
Georg Thieme Verlag Stuttgart 1960
- 10 Aquilla, E. and A. Stavitzky
The production and identification of antibodies to insulin and their use in assaying insulin. J. Clin. Invest. 35, 458 (1956 a)

- 11 Aquilla, E. and A. Stavitzky
Evidence for the insulin-directed specificity of rabbit anti-insulin serum. J. Clin. Invest. 35, 467 (1956 b)
- 12 McArthur, J., F. Ingersoll and J. Worcester
Die ICSH-Ausscheidung im Harn gesunder Männer und Frauen in verschiedenem Alter. J. Clin. Endocrin. a. Metab. 18/5, 460 (1958)
- 13 McArthur, J.W., J. Worcester and F.M. Ingersoll
The Urinary Excretion of Interstitial Cell Stimulating and Follicle Stimulating Hormone Activity During the Normal Menstrual Cycle. J. Clin. Endocrin. a. Metab. 18, 1186 (1958)
- 14 Aschheim, S.
Hormon und Schwangerschaft (Vortrag). Klin. Wschr. 6, 135 (1927)
- 15 Aschheim, S. und J. Zondek
Hypophysenvorderlappenhormon und Ovarialhormon im Harn von Schwangeren. Klin. Wschr. 6, 1322 (1927)
- 16 Aschner, B.
Über die Beziehungen zwischen Hypophysis und Genitale. Arch. Gynäk. 97, 200 (1912)
- 17 Bachmann, C., J.B. Collip and H. Selye
Antigonadotropic Substances. Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med. 32, 544 (1934)
- 18 Bettendorf, G.
Beeinflussung der hypogonadotropen Ovarialinsuffizienz durch hypophysäres Gonadotropin. Geburtsh. und Frauenhk. 22/10, 928 (1962)
- 19 Bickenbach, W. und G. Döring
Die neurohormonale Regulation der weiblichen Genitalfunktion. Dtsch. med. Wschr. 15, 517 (1951)
- 20 Bickenbach, W., G. Döring und C. Hossfeld
Experimentelle Frühovulation durch Zervixreizung beim Menschen. Arch. Gynäk. 192, 412 (1960)
- 21 Bickenbach, W., G. Döring und M. Uhlenhoff
Über den Einfluß der Rückenmarksdurchtrennung auf den Scheidenzyklus der weißen Ratte. Arch. Gynäk. 181, 524 (1952)
- 22 Bourdel, G. and C.H. Li
The effect of rabbit antiserum to sheep pituitary ICSH in adult female rats. Acta endocr. 42, 473 (1963)

- 23 Boyden, S.V.
The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by anti-protein sera. J. exp. Med. 93, 107 (1951)
- 24 Brody, S. and G. Carlström
Elimination of HCG in biological fluids by complement fixation. Lancet II 99 (1960)
- 25 Brody, S. and G. Carlström
The problem of specificity in serological determination of HCG. Acta endocr. 42, 485 (1963)
- 26 Brown, J.B. and J.A. Loraine
The extraction of gonadotrophins from urine for bioassay. J. Endocr. 13 II. Proceedings (1955)
- 27 Brown, P.S.
Human urinary gonadotrophins. II: In relation to the menstrual cycle, secondary amenorrhea and the response to estrogen. J. endocrin. 18, 46 (1959)
- 28 Brown, P.S.
Urinary gonadotrophins in postmenopausal women. J. Endocrin. 25, 427 (1963)
- 29 Brown, J.H., F.S. LaBella und F. Ulvedal
Untersuchungen über die intracelluläre Lokalisation der HVL-Hormone durch differenziertes Zentrifugieren. Endocrinology (Spr.) 66/1, 1 (1960)
- 30 Buchholz, R.
Quantitative Bestimmungen der gonadotropen Hypophysenhormone im Zyklus. Geburtsh. und Frauenhk. 17, 707 (1957)
- 31 Buchholz, R.
Untersuchungen über die Ausscheidungsverhältnisse der gonadotropen Hypophysenhormone FSH und ICSH im menstruellen Zyklus. Z. exper. Med. 128, 219 (1957)
- 32 Buchholz, R.
Untersuchungen über die Beeinflussung der Gonadotropinausscheidung bei Menschen durch Keimdrüsenhormone. Geb. und Frauenhk. 19, 851 (1959)
- 33 Buschbeck
Neuere Erkenntnisse über die Ovarialfunktion und ihre bildliche Darstellung. Zbl. Gynäk. 76, 1631 (1954)

- 34 Butt, W.R. and A.C. Crooke
Chromatography of urinary gonadotrophins. Ciba Found.
Colloqu. on Endocrin. 5/44, (1953)
- 35 Butt, W.R. und A.C. Crooke
Chromatography of urinary gonadotrophins.
(Acta endocrin. 42/3, 401 (1961)) Ciba Found.coll.End.5, 44
(1953)
- 36 Butt, W.R., A.C. Crooke and F. Cunningham
Weitere Beobachtungen über eine neue Methode zur
Gonadotropinextraktion aus dem Harn. Acta endocrin.
30/3, 378 (1959)
- 37 Butt, W., A. Crooke und F. Cunningham
Die Anwendung von Ionenaustauschern für die Fraktio-
nierung von Gonadotropinen aus dem Harn. Acta endocrin.
32/4, 509 (1959)
- 38 Claesson, L., B. Hogberg, R. Rosenberg and A. Westmann
Crystalline human chorionic gonadotrophin and its bio-
logical action. Acta endocrin. 1, 1 (1948)
- 39 Crooke, A.C. and W.R. Butt
Further Observations on chromatography of urinary
gonadotrophin. Proc. Roy. Soc. Med. 45, 805 (1952)
- 40 Daume, E. und W. Hohlweg
Lokale hormonelle Beeinflussung des Hypophysenzwischen-
hirnsystems bei Hähnen. Endokrinologie 37, 95 (1959)
- 41 Diczfalusy, E.
Chorionic gonadotrophin and oestrogens in the human
placenta. Acta endocrin. 12, Supplementum 12 (1953)
- 42 Diczfalusy, E. und H. Heinrichs
Gonadotropine und ihre Bestimmungen. Arch. Gynäk. 187,
556 (1956)
- 43 Diczfalusy, E. und H. Heinrichs
Grundlagen der statistischen Auswertung biologischer
Bestimmungen. Arch. Gynäk. 188, 496 (1957)
- 44 Dörner, G. und E. Daume
Über die Wirkung der Hormonkombination FSH und HCG
auf die Ovarien amenorrhöischer Frauen. Klin. Wschr.
39, 1260 (1961)
- 45 Eckertova, A.
Über die Abhängigkeit der Wirkung des Serumgonadotrop-
ins von der Applikationsart. Endokrinologie 42, 169
(1962)

- 46 v. Eickstedt und Hasselblatt
5. Symposion der Deutschen Ges. für Endokrinologie,
Freiburg (Brsg.) März 1957
- 47 Engle, E.T.
In Allens': Sex and Internal Secretions. London 1939
- 48 Evans, H.M. and J. Long
Characteristic effects upon growth, oestrus and ovulation
induced by the intraperitoneal administration of fresh
anterior hypophyseal substance. *Proc. nat. Anat.* 8, 38
(1922)
- 49 Evans, H.M., M. Simpson, W. Lyons and K. Turpeinen
Anterior pituitary hormones, which favour the produc-
tion of traumatic uterine placentomata. *Endocrinology*
28/9, 33 (1941)
- 50 Fevold, H.L.
Extraction and Standardization of Pituitary FSH and LH.
Endocrinology 51, 349 (1939)
- 51 Fevold, H., F. Hisaw and S. Leonhard
The gonad stimulating and the luteinizing hormones of
the anterior lobe of the hypophysis. *Amer. J. Physiol.*
27, 803 (1931)
- 52 Finney, D.J.
Statistical Methods in Biological Assay. London,
Charles Griffin Edit. 1952
- 53 Gaddum, J.H.
Bioassays and mathematics. *Pharm. Rev.* 5, 87 (1953)
- 54 Gördes, W.
Über die Methodik der Gonadotropinbestimmung und über
die Gesamtgonadotropinausscheidung im Postmenopausen-
harn vor und nach Verabreichung von 9a-brom-11-keto-
progesteron. Dissertationsschrift München 1963
- 55 Got, R., G. Levy und R. Bourillion
Zit. nach Nr. 127. *Experientia* (Basel) 15, 480 (1959)
- 56 Greep, R.O., H.B. van Dyke and B.F. Chow
Use of Anterior Lobe of Prostate Gland in Assay of
Metakentrin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 46, 644 (1941)
- 57 Hammerstein, J.
Hormonanalytische Untersuchungen zur Frage der endokri-
nen Korrelation im biphasischen Zyklus der Frau.
Arch. Gynäk. 196, 505 (1961)

- 58 Harris, G. and D. Jakobsohn
Functional Grafts of the anterior pituitary gland.
Proc. Roy. Soc. 139, 20 (1952)
- 59 Hellbaum, A., L. McArthur, P. Campbell and J.X. Finerty
Die physiologische Fraktionierung hypophysärer
gonadotroper Faktoren in Beziehung zu zytologischen
Veränderungen. Endokrinologie (Spr.) 68/1, 144 (1961)
- 60 Heller, C.G. und E.J. Heller
Gonadotropic hormone: Clinical application of extrac-
tion methods for assay purposes. Endocrinology (Spr.)
24, 319 (1939)
- 61 Heynemann, Th.
Die Nachkriegsamenorrhoe. Klin. Wschr. 129 (1948)
- 62 Hillarp, N.A.
Studies on the lokalisation of hypothalamic centres
controlling the gonadotrophic function of the hypo-
physis. Acta Endocrin. 2, 11 (1949)
- 63 Hohlweg, W. und E. Daume
Über die Wirkung intrazerebral verabreichten Dienöstrol-
diacetats bei Ratten. Endokrinologie 38, 46 (1959)
- 64 Hohlweg, W. und K. Junkmann
Die hormonal-nervöse Regulierung der Funktion des HVL.
Klin. Wschr., 321 (1932)
- 65 Hoogstra, M.J., F. Paesi, G. de Jongh and A. Engelbrecht
The FSH-content of the hypophysis of the rat as influen-
ced by gonadectomy and oestrogen treatment. Acta endocrin.
19, 49 (1955)
- 66 Johnsen, S.G.
A clinical routine-method for the quantitative deter-
mination of gonadotrophins in 24-hour urine samples.
Acta endocrin. 28, 69 (1958)
- 67 Johnsen, S.G.
Studies on urinary gonadotrophins: I. Large scale pre-
paration of highly active gonadotrophins from the urine
of postmenopausal women. II. Further purification of
highly active gonadotrophins from urine of postmenopausal
women. Acta endocrin. 20, 101, 106 (1955)
- 68 Johnsen, S.G.
A clinical routine method for the quantitative deter-
mination of gonadotrophins. II. Normal values for men
and women at all age groups from repuberty to senescense.
Acta endocrin. 31, 209 (1959)

- 69 Johnsen, S.G. and C. Hamburger
Untersuchungen über Harngonadotropine. IV: Qualitative Unterschiede zwischen den internationalen Vergleichspräparaten für HMG und anderen Extrakten aus dem Harn von Frauen in der Postmenopause. *Acta endocrin.* 32, 497 (1959)
- 70 Johnsen, S.G., A. Albert und Wilson
Zit. nach Nr. 9.
J. Clin. Endocrin. (Spr.) 10, 371 (1950)
- 71 Justisc, M. and P. Squire
Further evidences for the existence of several active components in sheep pituitary ICSH. *Acta endocrin.* 37, 96 (1961)
- 72 Kaiser, R.
Die hormonale Behandlung der Zyklusstörungen.
Gg. Thieme Verlag Stuttgart 1962
- 73 Kaiser, R., B. Mackert und W. Keyl
Die zeitliche Korrelation zwischen den Gonadotropin- und Oestrogenmaxima und dem Basaltemperaturanstieg im Zyklus. *Arch. Gynäkol.* 199, 414 (1964)
- 74 Kaivola, S., U. Kiistala und E. Axelson
Studies on serological pregnancy-test III.
Acta endocr. 42 (1963)
- 75 McKean, C.M.
Prerparation and use of antisera to human chorionic gonadotrophin. *Amer. J. Obstetr. Gynec.* 80, 596 (1960)
- 76 Kido, J.
Die menschliche Placenta als Produktionsstätte des sogenannten Hypophysenvorderlappenhormones. *Zbl. Gynäk.* 61, 1551 (1937)
- 77 Klinefelter, H.F., F. Albright and G.C. Griswold
Experience with a quantitative test for normal or decreased amounts of follicle stimulating hormone in the urine in endocrinological diagnosis. *J. clin. Endocrin.* 3, 529 (1943)
- 78 Klungsöyr, L. and K. Stöa
The chemical nature of human chorionic gonadotrophin. *Acta endocrin.* 18, 288 (1955)
- 79 Kovacic, N. und Loraine, J.
Studien über die Aktivität gonadotroper Extrakte, die aus menschlichem Urin hergestellt wurden. *Endocrinology* (Spr.) 68, 356 (1961)

80 Labhart

Klinik der Inneren Sekretion. J. Springer Verlag
Berlin - Göttingen - Heidelberg 1957

81 Lax, H.

Stöckels Lehrbuch der Gynäkologie. S. Hirzel-Verlag
Leipzig 1960

82 Lehrmann, D., P. Brody und R. Wortis

Vorhandensein des Partners und von Nestbaumaterial als
Anregung zur Entwicklung von Brutverhalten und Gonado-
tropinreaktion bei Ringtauben. Endocrinology (Spr.) 68,
507 (1961)

83 Levin. L. und H.H. Tyndale

The quantitative assay of follicle stimulating substances.
Endocrinology 21, 619 (1937)

84 Li, C.H., N. Moudgahl and H. Papkoff

Immunochemical investigations of human pituitary growth
hormone. J. biol. Chem. 235, 1038 (1960)

85 Li, C.H., M. Simpson and H.M. Evans

ICSH: II. Method of preparation and some physico-
chemical studies. Endocrinology (Spr.) 27, 803 (1940)

86 Liepmann, W.

Über ein für menschliche Placenta spezifisches Serum.
Dtsch. med. Wschr. 29, 383 (1903)

87 Lloyd, Morel, Morrow, Lobotsky und Huges

Zit. nach Nr. 9.
J. Clin. Endocrin. (Spr.) 9, 636 (1949)

88 Loraine, J.A.

Recent work on the quantitative determination of pitui-
tary gonadotrophins in human urine. Acta endocrin. 24,
Supplementum 31, 75 (1957)

89 Loraine, J.A. and J.B. Brown

Some observations on the estimation of gonadotrophins
in human urine. Acta endocrin. 17, 250 (1954)

90 Loraine, J.A. and J.B. Brown

The assay of urinary gonadotrophins from men and from
normally menstruating women in terms of HMG. J. of
Endocr. Proc. of the Soc. f. Endocr. 13, I (1955)

91 Loraine, J.A. and J.B. Brown

Further observations on the estimation of urinary
gonadotrophins in nonpregnant human subjects. J. Clin.
Endocr. a. Metab. 16, 1180 (1956)

- 92 Loraine, J.A. and J.B. Brown
A method for the quantitative determination of gonadotrophin in the urine of nonpregnant human subjects.
J. Endocrin. 18, 77 (1959)
- 93 Lostroh, A., P. Squire and C.H. Li
Bioassay of ICSH in the hypophysectomized male rat by the ventral prostate test. Endocrinology (Spr.) 62, 835 (1958)
- 94 Malbury, R.F. and J.R. Goodman
Zit. nach Nr. 42.
J. Clin. Endocr. a. Met. 14, 666 (1954)
- 95 Mandl, A.M.
Factors, influencing ovarian sensitivity to gonadotrophins. J. Endocr. 15, 448 (1957)
- 96 Martius, H.
Fluchtamenorrhoe. Dtsch. Med. Wschr. 347 (1946)
- 97 Murata, M. und K. Adachi
Über die künstliche Erzeugung des Corpus-luteum durch Injektion der Placentarsubstanz aus frühen Schwangerschaftsmonaten. Zschr. Geburtsh. (Stuttgart) 92, 45 (1928)
- 98 Nagy, D., I. Gabi und G. Keller
Paperchromatographie studies of pregnancy urine.
Acta endocr. 36, 431 (1961)
- 99 Odeblad, E.
Inactivation of HCG with alpha particles.
Acta endocr. 18, 291 (1955)
- 100 Pederson-Bjergaard, K. and M. Tonnesen
Estrogenic, Androgenic and Gonadotrophic Substances in the Urine of Normal Women. Sex Hormone Analysis I.
Acta endocrin. 1, 38 (1948)
- 101 Purves, H.D. and W.E. Griesbach
The site of FSH and LH-production in the rat pituitary.
Endocrinology 55, 785 (1959)
- 102 Read, C. and G.T. Bryan
Ciba Foundation Colloqu. Endocrin. 13, 68 (1960)
- 103 Read, C. and D.B. Stone
An immunologic assay for minutes amountes of human pituitary growth hormon. Amer. J. Dis. Child. 96, 538 (1958)

- 104 Rennels, G. Edward, Hildebrand and Finerty
Two tinctorial types of cells in the rat hypophysis and their relation to the gonadotrophic hormones. Anat. Rec. Philadelphia 125, 594 (1956)
- 105 Rigas, D., C. Paulsen and C. Heller
Die Reinigung von gonadotropem Hormon aus dem Urin und der Hypophyse des Menschen. Beobachtungen über ihr elektrophoretisches Verhalten und ihre biologische Aktivität. Endocrinology (Spr.) 62, 738 (1958)
- 106 Riusech, G.
Gonadotrophinoterapia en las amenorreas. Obstet. Ginec. Lat.-Amer. 18, 537 (1960)
- 107 Rotchild, J.
Relation of central nervous system, pituitary gonadotrophin and ovarian hormone secretion. Fertil. and Steril. 43, 246 (1962)
- 108 Salk, J.E.
Zit. nach Nr. 127.
J. Immunol. 49, 87 (1944)
- 109 Sawyer, C.H. and J.W. Everett
Stimulatory and inhibitory effects of progesterone on the release of pituitary ovulating hormone in the rabbit. Endocrinology (Spr.) 65, 644 (1959)
- 110 Scentagothai, Flerko, Mess and Halasz
Hypothalamic Control of the Anterior Pituitary. Akademiai Kiado Budapest 1962
- 111 Schneider, W.G. und H. Frahm
Über das sogenannte Choriongonadotropin. Arch. Gynäk. 188, 77 (1956)
- 112 Segaloff, A., S.L. Steelman, C. Everett and A. Flores
The preparation of an apparently homogenous gonadotropin from human menopausal urine. J. Clin. Endocrin. a. Metab. 19, 827 (1959)
- 113 Skreb, N.
Experimentelle Untersuchungen über die äußeren Ovulationsfaktoren bei der Fledermaus. Naturw. 41, 484 (1954)
- 114 Stämmli, H.J.
Sekundäre Amenorrhoe, Klassifizierung, Ergebnisse und Prognose nach Gonadotropinmedikation. Dtsch. Med. Wschr. 85, 2062 (1960)
- 115 Steelman, S.L. and F.M. Pohley
Assay of the Follicle Stimulating Hormone, Based on the Augmentation with human Chorionic Gonadotrophin. Endocrinology 53, 604 (1953)

- 116 Steward, J.
Hormone secretion by human placenta grown in eyes of rabbits. Amer. J. Obstetr. 61, 990 (1951)
- 117 Taleisnik, S. and S.M. McCann
Effects of hypothalamic lesions on the secretion and storage of hypophyseal luteinizing hormone. Endocrinology (Spr.) 68, 263 (1961)
- 118 Taubert, M.
Über die hypophysären Gonadotropine und die Bedeutung ihrer Bestimmung für die Diagnostik endokr. Störungen. Die Med. Wschr. 649 (1956)
- 119 Thomson, K. und R. Willemsen
Histochemische Untersuchungen über die Produktionsorte der Choriongonadotropine. Acta endocrin. 30, 161 (1959)
- 120 Tietze, K.
Zur Genese und Prognose der Notstandsamenorrhoe. Zbl. Gynäk. 377 (1948)
- 121 Twombly, G.H.
Studies of the nature of antigonadotrophic substances. Endocrinology (Spr.) 20, 311 (1936)
- 122 Walter, K.
Qualitative differences in gonadotrophic extracts from urine of postmenopausal women. J. Endocrin. 15, 119 (1957)
- 123 Walter, K. and S. Wepochi
Über die durch unspezifische Substanzen bedingte Änderungen der quantitativen und qualitativen Wirksamkeit von Gonadotropinen bei der biologischen Aktivitätsbestimmung. Acta endocr. 38, 181 (1961)
- 124 Weinbach, R.
Die Verwendbarkeit formolbehandelter Erythrozyten als Antigenträger in der indirekten Hämagglutination. Schweiz. Z. allg. Path. 21, 1043 (1958)
- 125 Westmann, A. und D. Jacobsen
Endocrinologische Untersuchungen an Ratten mit durchtrenntem Hypophysenstiel. Acta obstetr. et gynec. scand. 18, 99 (1938)
- 126 Wettstein und Benz
Process for production of hydrolysed Chorionic Gonadotrophin. DBP 878694 v. 25.7.1951 und Engl. P. 689088 v. 25.7.1951

- 127 Wide, L.
An immunological method for the assay of HCG.
Acta endocr. Supplementum 70 (1962)
- 128 Wide, L. and C. Gemzell
Immunological determination of pituitary luteinizing hormone in the urine of fertile and postmenopausal women and adult men. Acta endocr. 39, 539 (1962)
- 129 Woods, M.C. and M.E. Simpson
Pituitary control of the testies of the hypophysectomized rat. Endocrinology 69, 91 (1962)
- 130 Zondek, B.
Die Hormone des Ovars und Hypophysenvorderlappens.
Berlin 1931

Zum Schluß danke ich noch Herrn Prof. Dr. W. Bickenbach für das Interesse, das er den Gonadotropinuntersuchungen entgegengebracht hat.

Zu besonderem Dank bin ich Herrn Prof. Dr. R. Kaiser verpflichtet, der mir das Dissertationsthema überlassen und mich bei der Durchführung der Untersuchungen wesentlich unterstützt und gefördert hat.

Auch Herrn Dr. E. Daume danke ich für seine Ratschläge bei der Fertigstellung der Arbeit.

Bei der technischen Durchführung der Versuche stand mir in dankenswerter Weise auch Frl. Selbherr zur Seite.

L E B E N S L A U F

Ich wurde am 24. 3. 1940 als Sohn des Lehrers Michael Geiger und seiner Frau Rosa, geb. Glas, in Wasserburg am Inn geboren. Von 1946 bis 1950 besuchte ich die Volksschule in Edling bei Wasserburg, von 1950 bis 1956 die Oberrealschule in Wasserburg und von 1957 bis zur Reifeprüfung im Juni 1959 die Oberrealschule in Rosenheim. Dorthin waren meine Eltern infolge einer Versetzung meines Vaters verzogen.

Im November 1959 begann ich das Studium der Medizin an der Universität München, legte im Oktober 1960 das Vorphysikum, im Februar 1962 das Physikum ab und beendete am 18. Juni 1965 das medizinische Staatsexamen mit Note I. Während des klinischen Studiums famuliert~~e~~ ich insgesamt 6 Monate in Rosenheim, Desenzano/Italien und in Bad Mergentheim.

